

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ
À UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
ÉMILIE SEXTON

LES PROSTAGLANDINES ET LE CANCER ENDOMÉTRIAL HUMAIN :
LE RÔLE DU RESVÉRATROL

JANVIER 2006

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Ce mémoire est présenté sous forme d'article scientifique qui constitue le chapitre II du présent travail. Le chapitre I est une revue de la littérature présentant une vue globale du sujet de recherche présenté. Les auteurs du chapitre II sont : moi-même, Émilie Sexton, qui a fait la majorité des expériences requises, le traitement des données obtenues et la rédaction de l'article; Kim Leblanc, étudiante à la maîtrise, qui a contribué à la grande majorité des expériences; Sophie Parent, professionnelle de recherche au laboratoire, qui a effectué les travaux finaux pour l'article; Pascal Lemoine, stagiaire à l'été 2004, qui a contribué à une partie des expériences; Éric Asselin, professeur au département de chimie-biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières et directeur de recherche, qui est intervenu au niveau de l'élaboration de la stratégie expérimentale, de la supervision des travaux et de la révision de l'article. Le chapitre III est une discussion et une conclusion globale des résultats obtenus au cours de ma maîtrise.

Je voudrais remercier tous les gens qui ont contribué à ce que ce projet soit aussi intéressant et passionnant. Tout d'abord, mon directeur de recherche, Éric Asselin, et la professionnelle de recherche, Sophie Parent, pour la confiance qu'ils ont eu en moi, mais surtout pour leur compétence et leur disponibilité. Je désire aussi remercier ma collègue et amie Kim Leblanc qui a été d'une grande aide pour l'ensemble de mon travail. Merci à Marie-Claude Déry, Véronique Gagnon, Valérie Leblanc, Isabelle Mathieu et Céline Van Themcshe qui m'ont appris le travail en laboratoire et à Pascal Lemoine qui, pendant tout un été, m'a aidé dans la réalisation de mes expériences. Un gros merci à tous les autres étudiants que j'ai côtoyé au laboratoire. Un merci très spécial à mes parents, mon frère, mon conjoint et sa famille pour leurs perpétuels encouragements. En terminant, je voudrais remercier le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) pour le soutien financier tout au long de ma maîtrise et l'Université du Québec à Trois-Rivières pour le soutien financier, mais aussi pour avoir été ma deuxième maison durant mes années de baccalauréat et de maîtrise.

RÉSUMÉ

En occident, le cancer endométrial humain est le quatrième cancer en incidence chez la femme, mais il est le cancer gynécologique le plus fréquent. La cyclooxygénase-1 et -2 (COX-1 et -2) sont les enzymes limitants de la transformation de l'acide arachidonique, un acide gras présent dans les membranes cellulaires, en prostaglandines (PGs). Ces dernières, plus particulièrement la prostaglandine E₂ (PGE₂), sont des éléments clés dans l'évolution et la transformation d'une tumeur. L'action de la PGE₂ se fait via quatre récepteurs : EP1, EP2, EP3 et EP4. L'objectif de cette étude était, tout d'abord, de déterminer la présence en ARNm et en protéines COX-1 et COX-2 et en ARNm des quatre récepteurs à la PGE₂ chez les six lignées cellulaires gynécologiques humaines étudiées (HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa et TOV-1078D). Pour réaliser cet objectif, du RT-PCR quantitatif en temps réel a été effectué sur les lignées cellulaires afin de mesurer les taux des ARNm des COXs et des quatre récepteurs de la PGE₂. Des analyses par Western blot ont été effectuées afin de mesurer l'expression protéique des COXs. Les résultats indiquent que seules les lignées HeLa, HEC-1-A, RL-95-2 et Ishikawa expriment et produisent la COX-1 et/ou la COX-2 et expriment des taux considérables d'ARNm de l'un ou l'autre des récepteurs à la PGE₂. Le second objectif était de déterminer si le resvératrol, un antioxydant présent dans le vin rouge, pouvait influencer la production de PGE₂ et entraîner la mort apoptotique ou la prolifération cellulaire des six lignées cancéreuses à l'étude. Suite à des tests de prolifération cellulaire au MTT et des analyses Western blot avec le marqueur de prolifération CDC47, les résultats indiquent que le resvératrol tend à induire une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses étudiées (excepté chez les cellules KLE) et ce, de manière dose et temps dépendant, mais variable selon la lignée cellulaire. Différentes méthodes de détection de l'apoptose (Hoechst, fragmentation d'ADN et Western blot contre la caspase-3 clivée) indiquent que le resvératrol induit à forte dose l'apoptose chez les cellules HeLa, HEC-1-A, Ishikawa, RL-95-2 et TOV-1078D alors que les cellules KLE demeurent résistantes. Puis, en réponse au resvératrol, la sécrétion de PGE₂ diminue chez toutes les lignées cellulaires qui expriment COX-1 et/ou COX-2. Puisque le resvératrol agit également chez les cellules TOV-1078D qui ne possèdent ni

COX-1, ni COX-2, le dernier objectif consistait alors à déterminer la ou les autres cibles cellulaires de celui-ci. Différentes cibles cellulaires telles que la PI 3-k, PKA, PKC, MEK-1 et p38 MAPK ont été investiguées avec différents inhibiteurs, mais les résultats indiquent que le resvératrol n'agit pas sur ces cibles. En conclusion, le resvératrol induit une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose chez cinq des six lignées cellulaires étudiées. Le resvératrol agirait possiblement via l'inhibition de l'activité enzymatique des COXs, induisant donc une diminution de production en PGE₂, et/ou via un ou plusieurs autres mécanismes toujours inconnus à ce jour.

Mots clés : Cancer endométrial humain, prostaglandines E₂, COX-1, COX-2, récepteurs à la PGE₂, resvératrol, prolifération cellulaire, apoptose.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS.....	ix
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1. Revue de la littérature.....	2
1.1. Cancer de l'endomètre.....	2
1.1.1. Anatomie, histologie et physiologie de l'utérus sain.....	2
1.1.2. Cancérologie.....	5
1.1.3. Causes	7
1.1.4. Signes, symptômes et diagnostic de la maladie	8
1.1.5. Traitements.....	8
1.1.5.1. La chirurgie	9
1.1.5.2. La radiothérapie.....	9
1.1.5.3. La chimiothérapie.....	10
1.1.5.4. L'hormonothérapie	11
1.1.6. Les voies d'avenirs	11
1.2. Mort cellulaire	12
1.2.1. Apoptose	12
1.2.1.1. Les caspases	14
1.2.2. Autres morts cellulaires	15
1.3. Les prostaglandines et les cyclooxygénases	16
1.3.1. Les prostaglandines	16
1.3.2. Les cyclooxygénases	18
1.3.3. Les récepteurs de la prostaglandine E ₂	19

1.4. Le resvératrol.....	20
1.4.1. Caractéristiques	20
1.4.2. Ses modes d'actions.....	21
2. Les objectifs du travail.....	24
CHAPITRE II EFFECT OF RESVERATROL ON CELL SURVIVAL AND APOPTOSIS OF HUMAN ENDOMETRIAL CANCER CELLS	25
Résumé.....	26
Effect of resveratrol on cell survival and apoptosis of human endometrial cancer cells	27
Abstract.....	28
Introduction	29
Materials and methods.....	30
Results.....	35
Discussion	37
Conclusion	41
Acknowledgements	41
Figures legends.....	42
Figures	45
References	54
CHAPITRE III CONCLUSION GÉNÉRALE	60
Discussion et conclusion.....	61
BIBLIOGRAPHIE	73

LISTE DES FIGURES

1.1	Anatomie de l'appareil génital féminin	3
1.2	Coupe histologique de l'utérus.....	4
1.3	Représentation schématique du mécanisme d'apoptose.....	13
1.4	Représentation schématique de l'activité des caspases	15
1.5	Représentation schématique de la synthèse des prostaglandines et de la thromboxane A ₂ à partir de l'acide arachidonique	17
1.6	Représentation schématique des rôles de la PGE ₂	18
1.7	Représentation schématique de l'activité des récepteurs à la PGE ₂	20
1.8	Représentation schématique de la structure chimique du resvératrol.....	21
1.9	Schéma comparatif des structures chimiques de l'œstrogène, de l'œstrogène synthétique (le diéthylstilbestrol) et du resvératrol	22
2.1	Levels of COX-1 mRNA, COX-2 mRNA, COX-1 protein and COX-2 protein in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells as determined by quantitative RT-PCR using the LightCycler and Westerns analyses respectively	45
2.2	Levels of EP1, EP2, EP3 and EP4 mRNA in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells as determined by quantitative RT-PCR using LightCycler	46

2.3	Effect of resveratrol on cellular proliferation in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells for a period of 24 hours, 48 hours and 72 hours, as determined by the MTT proliferation assay	47
2.4	Effect of resveratrol on PGE ₂ production in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells for a period of 48 hours, as determined by the EIA assay.	48
2.5	Effect of resveratrol in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells on apoptosis induction, after a period of 48 hours, as determined by Hoescht nuclear staining and DNA fragmentation.....	49
2.6	Effect of resveratrol on Cleaved caspase-3 and CDC47 levels in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells for a period of 48 hours	50
2.7	Effect of resveratrol in the presence or absence of LY294002 (5μM) and NS-398 (5μM) on cellular proliferation in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells for a period of 48 hours, as determined by the MTT proliferation assay	51
2.8	Effect of resveratrol in the presence or absence of KT 5720 (5μM), chelerythrine chloride (5μM), PD98059 (5μM) and SB 203580 (5μM) on cellular proliferation in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells for a period of 48 hours, as determined by the MTT proliferation assay.....	52
2.9	Effect of PGE ₂ in the presence or absence of resveratrol on cellular proliferation in Ishikawa and TOV-1078D cells, for a period of 48 hours, as determined by the MTT proliferation assay.....	53

LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS

α	alpha
ADN ou DNA	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPc	AMP cyclique ou adénosine 3',5'-monophosphate
ARNm ou mRNA	acide ribonucléique messenger
β	bêta
cDNA	acide désoxyribonucléique complémentaire
cm ²	centimètre carré
CO ₂	dioxyde de carbone
COXs	cyclooxygénases
COX-1	cyclooxygénase-1
COX-2	cyclooxygénase-2
DMSO	diméthyl sulfoxide
dNTPs	déoxynucléotidestriphosphates
dT	déoxythymidine
DTT	dithiothreitol
EIA	essai immunoenzymatique
ER- α	Récepteur à l'œstrogène α
EtOH	éthanol
FBS	sérum bovin fœtal
Fig.	figure
g	gramme
GBS	sérum de croissance bovin
h	heure
HCl	acide chloridrique
HRP	"horse radish peroxidase"
IP3	inositol triphosphate
κ	kappa
kDa	kilodalton

l	litre
LDL	"low density lipoprotein"
M	Molaire
MAPK	"mitogenic associated protein kinase"
min.	minute
m	milli
MMLV-RT	"Muloney murine leukemia virus-reverse transcriptase"
mol	mole
MTT	bromide de 3-(4, 5-diméthylthiazolyl-2)-2, 5-diphényltétrazolium
NaCl	chlorure de sodium
NSAID	anti-inflammatoire non-stéroïdien
p	pico
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PGs	prostaglandines
PGD ₂	prostaglandine D ₂
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PGF ₂ α	prostaglandine F ₂ alpha
PGG ₂	prostaglandine G ₂
PGH ₂	prostaglandine H ₂
PGI ₂	prostaglandine I ₂
PGDS	prostaglandine D synthase
PGES	prostaglandine E synthase
PGFS	prostaglandine F synthase
PGIS	prostaglandine I synthase
PGS	prostaglandine synthase
PI 3-k	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLA ₂	phospholipase A ₂

RT	température pièce
RT	"reverse transcriptase"
RT-PCR	transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TXs	Thromboxanes
TXA ₂	Thromboxane A ₂
TXS	Thromboxane synthase
V	volt
μ	micro
UV	ultraviolet
°C	degré Celsius

CHAPITRE I
INTRODUCTION

1. Revue de la littérature

1.1. Le cancer de l'endomètre

Le cancer est une maladie de plus en plus fréquente au 21^{ème} siècle et le cancer endométrial ne fait pas exception. En effet, ce type de cancer est le quatrième en incidence chez la femme caucasienne, mais il est le plus fréquent cancer gynécologique diagnostiqué (Société Canadienne du Cancer). Pour l'année 2005, Statistiques Canada prévoyait que 3900 femmes recevraient un diagnostic positif d'un cancer endométrial et que 710 d'entre elles en mourraient. Il existe des solutions pour traiter ce cancer. Une de celles-ci est un traitement aux agents chimiothérapeutiques (voir section 1.1.5.3). Par contre, les agents couramment utilisés pour ces traitements entraînent plusieurs effets secondaires. Parfois, ils ne sont pas totalement efficaces et plusieurs tumeurs y sont résistantes. Il devient donc très important de trouver une autre molécule capable de guérir le cancer endométrial humain, voire même le prévenir.

1.1.1. Anatomie, histologie et physiologie de l'utérus sain

L'utérus (figure 1.1) est un petit organe qui a la grosseur et la forme d'une poire inversée et qui est situé dans le bassin de la femme, entre la vessie et le rectum. Il est impliqué dans plusieurs événements au cours de la reproduction (Tortora,2001). En effet, l'utérus fait partie du parcours des spermatozoïdes qui se dirigent vers les trompes de Fallope afin d'y féconder l'ovule. De plus, il est le siège de l'implantation de l'ovule fécondé, du développement de l'embryon et du fœtus durant la grossesse et il est mis à contribution lors de l'accouchement. L'utérus est également le siège des menstruations et ce, en absence d'ovule fécondé (Tortora,2001).

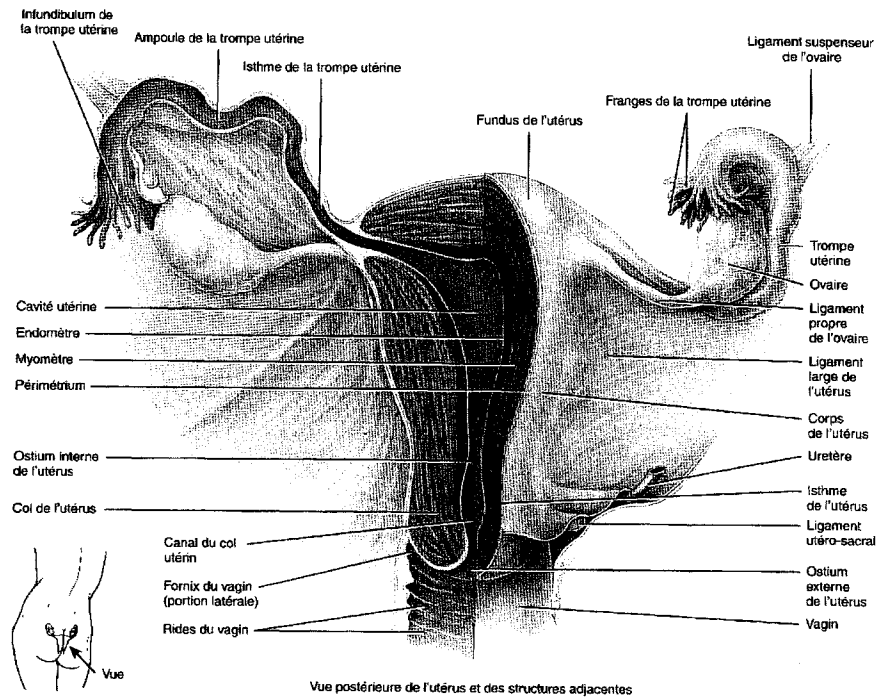


FIGURE 1.1 : Anatomie de l'appareil génital féminin (Tortora,2001).

D'un point de vue anatomique, l'utérus se divise en quatre parties : le fundus, la partie supérieure arrondie de l'utérus, le corps, la portion centrale effilée de l'utérus, le col, la partie inférieure étroite qui s'ouvre dans le vagin et l'isthme, la portion rétrécie située entre le corps et le col utérin (Tortora,2001). D'un point de vue histologique, le corps de l'utérus se subdivise en trois parties : le p rim trium, le myomètre et l'endomètre (Tortora,2001). Le p rim trium est une séreuse recouvrant l'utérus et faisant partie du péritoine viscéral. Le myomètre est composé de trois feuillets de fibres musculaires lisses, dont les couches externes et internes qui sont constituées de fibres musculaires longitudinales ou obliques et la couche moyenne qui est composée de fibres musculaires circulaires. L'endomètre (figure 1.2) est la tunique interne de l'utérus. C'est une muqueuse glandulaire composée d'un épithélium prismatique simple qui fait face à la lumière utérine, d'un stroma sous-jacent (tissu conjonctif) et de plusieurs glandes utérines qui s'invaginent dans l'épithélium pour se terminer près du myomètre. L'endomètre est constitué de deux couches cellulaires : une basale et une fonctionnelle (Tortora,2001). La couche fonctionnelle est la couche directement en contact avec la lumière utérine et elle se desquame au cours de la menstruation. La

couche basale est la couche permanente qui élabore une nouvelle couche fonctionnelle après chaque menstruation. Le col utérin n'est pas tapissé d'un endomètre, mais plutôt d'un épithélium cylindrique haut, muco-sécrétant.

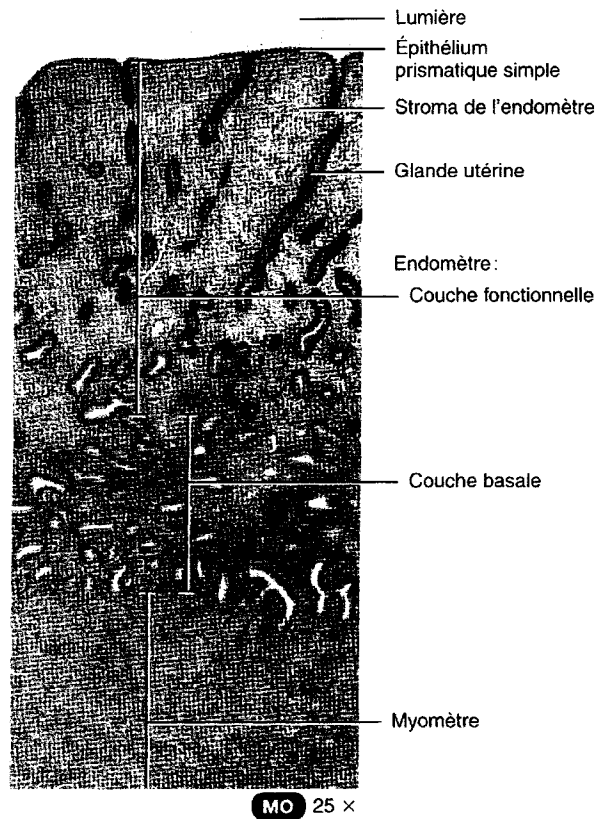


FIGURE 1.2 : Coupe histologique de l'utérus (Tortora, 2001).

L'endomètre, en réponse aux différentes hormones sécrétées par les ovaires au cours du cycle menstruel, s'épaissit dans le but de recevoir un ovule fécondé. L'œstrogène, sécrété principalement durant la phase pré-ovulatoire de l'endomètre permet la prolifération cellulaire de la couche basale et ainsi la construction de la couche fonctionnelle qui fait face à la lumière utérine (Franz, III, 1988). Par la suite, la progestérone, en combinaison avec l'œstrogène, intervient dans la phase post-ovulatoire et permet la préparation de l'endomètre à l'implantation d'un ovule fécondé dans la couche fonctionnelle, par la croissance et l'enroulement des glandes utérines, l'augmentation de liquide dans les tissus, la vascularisation et l'épaississement de

l'endomètre (Franz, III,1988). En absence d'ovule fécondé, la couche fonctionnelle de l'endomètre se desquame : il y a menstruation. Un nouveau cycle menstruel pourra alors débiter et la couche basale de l'endomètre, qui elle est permanente, permettra la régénération de la couche fonctionnelle.

1.1.2. Cancérologie

Le cancer est une maladie qui prend naissance dans nos cellules. Dans un organisme sain, les cellules répondent aux instructions qui leur sont données par les autres cellules du corps. Lorsqu'une cellule est endommagée, des mécanismes d'autodestruction et d'élimination des déchets sont enclenchés (Griffiths,2001). Dans un cas de cancer, la cellule est incapable de mourir; il y a donc prolifération continue de la cellule anormale et formation d'une masse cellulaire. Cette masse peut être bénigne si les cellules qui la constituent ressemblent aux cellules originales et agissent comme celles-ci (Stevens,2000). Dans ce cas, ces cellules demeurent circonscrites dans leur tissu d'origine et ne sont pas un danger pour l'organisme. Dans le cas où les cellules de la masse sont différenciées et qu'elles ne sont donc plus capables d'exercer leurs fonctions, on parle alors de tumeur maligne ou de cancer (Stevens,2000). Ces cellules ont la capacité d'envahir le système et de se loger sur d'autres organes pour former des tumeurs secondaires que l'on nomme métastases.

Les cellules endométriales sont très vulnérables aux transformations cancéreuses puisqu'elles sont constamment en multiplication durant le cycle menstruel. Le risque de mutations génétiques provoquant l'immortalité d'une cellule est donc grandement augmenté. De plus, l'endomètre, étant richement vascularisé et soumis à plusieurs facteurs de prolifération cellulaire, représente un lieu favorable au développement et au maintien des cellules cancéreuses.

Le cancer de l'endomètre fait partie de la famille des cancers utérins (National Cancer Institute,2001). Dans la majorité des cas, le cancer se développe dans les cellules ciliées ou sécrétrices des glandes de l'endomètre. On nomme alors ce type de

cancer adénocarcinome de l'endomètre. On parle de sarcomes stromaux endométriaux lorsque la masse de cellules cancéreuses origine du tissu conjonctif de l'endomètre. Les carcinosarcomes endométriaux se développent à la fois au niveau de l'épithélium et du tissu conjonctif. Outre les cancers endométriaux, il existe d'autres types de cancers de l'utérus dont entre autre les léiomyomes, qui eux se développent dans la paroi musculaire de l'utérus, et les cancers du col de l'utérus, qui, comme le nom l'indique, se développent dans les cellules du col de l'utérus. Parfois les cellules d'un cancer deviennent trop indifférenciées et il est impossible d'identifier son origine. On appelle ces cancers carcinomes indifférenciés.

Le cancer de l'endomètre est classifié selon des stades de I à IV (National Cancer Institute, 2001). Un cancer de stade I est un cancer qui est limité au corps de l'utérus. Un stade II correspond à un cancer qui s'étend du corps au col utérin. On parle de cancer endométrial de stade III quand le cancer s'est propagé à l'extérieur de l'utérus, sans toutefois s'étendre à l'extérieur de la zone pelvienne. Finalement, le stade IV est le stade où le cancer forme des métastases à l'extérieur de la zone pelvienne. Les principaux lieux des métastases dans un cas de cancer de l'endomètre sont la vessie, le rectum, le foie, les poumons et les os.

Quatre principaux mécanismes génétiques ont un rôle dans le développement du cancer chez l'humain (Stevens, 2000). Il y a le fonctionnement anormal du système de réparation de l'ADN qui intervient dans la carcinogénèse. En effet, une cellule possède des mécanismes lui permettant d'interrompre le cycle cellulaire et de réparer les mutations survenues dans son ADN. Sans ce genre de système, les mutations se transmettent de génération en génération altérant ainsi le fonctionnement adéquat de la cellule. Puis, il y a la transformation d'un gène normal de survie cellulaire (proto-oncogène) en oncogène. Dans ce cas, le gène de survie sera toujours actif permettant ainsi la prolifération continue de la cellule. Le fonctionnement anormal d'un gène suppresseur de tumeur est un facteur qui intervient dans le développement du cancer. Ces gènes codent normalement pour des protéines qui envoient des signaux de mort aux cellules défectueuses. Ce sont donc des anti-oncogènes. Une défectuosité à ce niveau

permet une prolifération continue de la cellule étant donné qu'une protéine du suicide cellulaire n'assume plus sa fonction. La suractivation de gènes qui dans des circonstances normales préviennent la mort cellulaire est aussi un événement impliqué dans la cancérisation. Dans la majorité des cas de cancers, il y a présence de ces quatre mécanismes.

1.1.3. Causes

Le cancer de l'endomètre n'est pas attribuable à une seule et unique cause. Par contre, plusieurs études ont démontré que toutes situations augmentant l'exposition d'une femme aux œstrogènes augmentent les risques de développer un cancer de l'endomètre (Gambrell, Jr., 1977; Thom, 1980). Les femmes de 50 ans et plus sont les plus à risque de développer ce type de cancer puisqu'elles ont été soumises à plusieurs cycles œstrogéniques au cours de leur vie. Celles ayant eu leurs premières menstruations à un âge précoce et une ménopause tardive seront exposées aux œstrogènes sur une longue période augmentant ainsi le risque de développer un cancer de l'endomètre. Des études ont démontré qu'un traitement prolongé au médicament nommé tamoxifène augmenterait les risques de cancer de l'endomètre (Burke, 2005). En effet, le tamoxifène est un anti-œstrogène synthétique utilisé comme traitement du cancer du sein, mais qui, au niveau de l'endomètre, agit comme agoniste de l'œstrogène, augmentant ainsi les risques de développer un cancer endométrial (Fisher, 1994). Puis, étant donné que les cellules adipeuses possèdent des aromatasases ayant la capacité de transformer des précurseurs de l'œstrogène, des androgènes tous dérivés de la prégnénolone, en œstrogène (Deslypere, 1985), les personnes obèses produiront des quantités élevées d'œstrogène, augmentant une fois de plus le risque de développer ce cancer.

Il existe, par contre, des facteurs de protection du cancer de l'endomètre. La contraception orale avec progestérone semble avoir un effet protecteur au niveau de l'endomètre. La progestérone inhiberait l'effet de l'œstrogène sur l'endomètre (Chen, 2005), diminuant ainsi le risque de cancer de l'endomètre. Le nombre de

grossesse d'une femme peut également devenir un facteur de protection. Étant donné que les cycles menstruels cessent au cours d'une grossesse, la femme sera donc exposée à une quantité moins grande en œstrogène au cours de sa vie et sera moins à risque de développer ce cancer. Par contre, la nulliparité et l'infertilité chez la femme deviennent donc des facteurs de risque du cancer endométrial.

1.1.4. Signes, symptômes et diagnostic de la maladie

Le signe classique du cancer de l'endomètre est un saignement vaginal anormal (National Cancer Institute, 2001), soit un saignement entre les menstruations, un saignement abondant durant les menstruations, un saignement chez la femme ménopausée ou encore un saignement après une relation sexuelle. Le cancer peut aussi se manifester par des douleurs pelviennes ou par des pertes vaginales aqueuses, jaunâtres et nauséabondes. À un stade plus avancé de la maladie, les signes et symptômes deviennent plus généralisés comme, par exemple, une perte de poids, une faiblesse généralisée, des problèmes intestinaux ou encore des hémorragies. Tous ces signes et symptômes peuvent être retrouvés en cas de cancer de l'endomètre, mais ne sont pas nécessairement annonciateurs d'un cancer de l'endomètre.

Le diagnostic du cancer de l'endomètre se fait surtout par dilatation du col de l'utérus et par prélèvement d'un morceau de tissu endométrial, par biopsie ou curetage de l'endomètre. Par l'analyse du tissu au microscope, le pathologiste sera en mesure de déterminer s'il s'agit de cellules cancéreuses selon différentes caractéristiques dont, entre autre, la morphologie cellulaire, la morphologie nucléaire, la quantité de cellules en mitose et le rapport noyau/cytoplasme (Stevens, 2000). C'est également lors de ces tests que le pathologiste peut déterminer le type de cancer et le stade de celui-ci.

1.1.5. Traitements

Le cancer de l'endomètre, lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce de la maladie, est un cancer qui donne un taux de survie assez élevé, soit près de 80%

(Statistiques Canada). Les principaux traitements à ce jour sont : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie. Le choix du traitement dépendra principalement de la grosseur et du stade de la tumeur. Ces traitements peuvent être employés seuls, surtout dans un stade précoce de la maladie où souvent seule la chirurgie est nécessaire. Par contre, il existe plusieurs cas où il est impossible d'appliquer ces solutions seules et où l'on doit alors les appliquer en combinaison.

1.1.5.1. La chirurgie

La chirurgie consiste à enlever la masse cancéreuse, mais dans la majorité des cas, surtout lorsque la femme n'est plus en âge de se reproduire, on procède à une hystérectomie totale avec salpingo-ovariectomie bilatérale (National Cancer Institute, 2001). Cette chirurgie consiste en fait à enlever l'ensemble de l'utérus, mais aussi les deux trompes de Fallope et les deux ovaires. Cette intervention peut se faire par voie abdominale ou vaginale. Souvent, quelques ganglions locaux seront également excisés afin de s'assurer que le cancer ne s'est pas propagé. Bien que cette méthode soit radicale puisqu'elle consiste à l'ablation totale de l'appareil reproducteur interne féminin, elle est peu dangereuse, elle évite les récurrences et elle est souvent utilisée seule, sans avoir recours à d'autres traitements comme la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie.

1.1.5.2. La radiothérapie

La radiothérapie est en fait la destruction des cellules cancéreuses par rayons X de haute énergie et elle est surtout employée chez les patientes souffrant d'un cancer de stade I, II ou III (National Cancer Institute, 2001). Il existe deux types de radiothérapie. La première est par voie externe et consiste à envoyer les rayons directement sur la tumeur de façon à épargner le plus possible les tissus sains. En radiothérapie interne, aussi appelée curiethérapie, des tubes contenant des éléments radioactifs sont directement insérés dans le vagin. Cette technique est très efficace pour tuer les cellules cancéreuses, mais elle touche parfois les cellules saines, ce qui en fait son inconvénient.

le plus important. Certaines patientes auront recours aux deux types de radiothérapie. Dans la majorité des cas, la radiothérapie est utilisée en combinaison avec la chirurgie chez les patientes ayant un cancer plus largement étendu.

1.1.5.3. La chimiothérapie

Lorsque le cancer n'est pas complètement éliminé après une première thérapie, on a recours à la chimiothérapie. La chimiothérapie est la thérapie qui consiste à détruire le cancer par l'administration de médicaments qui vont aller interférer avec les mécanismes intracellulaires des cellules cancéreuses (voir section 1.1.2 Cancérologie) et ainsi empêcher le développement et la propagation de celles-ci (Kufe,2003). Les médicaments peuvent être administrés en monothérapie, mais, dans la plupart des cas, on utilise une combinaison de molécules chimiothérapeutiques. On utilise différentes molécules qui ont des pourcentages d'efficacité variables, telles le paclitaxel (efficace dans 36% des cas), le carboplatine (efficace dans 29% des cas), la doxorubicine (efficace dans 26% des cas), le cisplatine (efficace dans 25% des cas), et bien d'autres (Kufe,2003). Lorsque deux molécules chimiothérapeutiques sont utilisées en combinaison, l'efficacité du traitement est augmentée, comme c'est le cas pour une combinaison doxorubicine-cisplatine, où le pourcentage de réponse au traitement est augmenté à 62% (Kufe,2003). L'administration de ces médicaments se fait par voie intraveineuse. Bien que la chimiothérapie soit très efficace pour tuer les cellules cancéreuses, les molécules attaquent aussi les cellules saines du corps entraînant ainsi des effets secondaires tels des nausées, des vomissements, une perte d'appétit, une fatigue, une perte de cheveux et un risque accru d'infections (National Cancer Institute,2001). De plus, certains médicaments chimiothérapeutiques augmentent les risques de développer un autre cancer. C'est le cas du tamoxifène, un traitement efficace utilisé pour traiter les femmes atteintes d'un cancer du sein, mais qui, dans plusieurs cas, développeront quelques années plus tard un cancer endométrial, causé par ce médicament (Fisher,1994). Le tamoxifène, au niveau des cellules du sein, a un effet antiprolifératif puisqu'il agit comme antagoniste de l'œstrogène. Par contre, il induit la

prolifération cellulaire des cellules endométriales par son effet agoniste des récepteurs à l'œstrogène.

1.1.5.4. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est le traitement le moins souvent employé, puisque son efficacité est très faible, soit moins de 10% (Kufe,2003). Elle consiste à administrer à la patiente des comprimés ou des injections d'hormones, qui le plus souvent est la progestérone (National Cancer Institute,2001). Ceci permet de freiner la prolifération cellulaire et ainsi réduire la taille de la tumeur. Seules les cellules cancéreuses bien différenciées qui expriment encore les récepteurs à l'hormone administrée peuvent répondre à ce traitement (Davies,2005). L'hormonothérapie a un effet systémique puisqu'elle peut affecter toutes les cellules du corps qui produisent les récepteurs à l'hormone utilisée.

1.1.6. Les voies d'avenir

Bien que le cancer endométrial soit un cancer qui a un taux de survie élevé, soit près de 80%, les solutions pour le contrer sont radicales (chirurgie) et provoquent des nombreux effets secondaires (radiothérapie et chimiothérapie). L'inconvénient majeur est le fait que ces traitements soient inefficaces chez plusieurs patientes. Les chercheurs mettent tous leurs efforts à comprendre les mécanismes de résistance aux traitements (Gagnon,2004a) ou encore essaient de trouver de nouvelles molécules qui pourraient être efficaces pour traiter ce cancer (Gagnon,2004b). Par contre, depuis quelques années, les chercheurs concentrent de plus en plus leurs efforts à la prévention de la maladie. Des études démontrent que la diète et l'activité physique pourraient prévenir le cancer de l'endomètre (Goodman,1997; Olson,1997). De plus, différentes molécules naturellement présentent dans les aliments ont été étudiées dans la prévention du cancer, entre autre dans la prévention du cancer de la prostate (James,2003; Stacewicz-Sapuntzakis,2005). Par exemple, le resvératrol (voir section 1.4) est une molécule de plus en plus étudiée au niveau du cancer de la prostate (Hsieh,1999), du sein

(Mgbonyebi,1998) et du colon (Schneider,2000) et pourrait devenir une bonne solution pour traiter et même prévenir le cancer de l'endomètre.

1.2. Mort cellulaire

Dans un état physiologique normal, la prolifération cellulaire est un processus bien contrôlé. Il doit y avoir un contrôle génétique du nombre de cellules et ce, grâce à un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Lorsqu'il y a un dérèglement de la mort cellulaire, on assiste alors à une prolifération cellulaire incontrôlée, tel est le cas dans le cancer. Il existe plusieurs types de mort cellulaire dont le plus connu et le plus étudié est l'apoptose.

1.2.1. Apoptose

L'apoptose, un processus de mort cellulaire découvert au début des années 1970 (Kerr,1972), est l'autodestruction d'une cellule et l'élimination de ses déchets, suite à des dégâts intracellulaires (voie intrinsèque) ou par des signaux émis par les cellules avoisinantes (voie extrinsèque). L'apoptose est en quelque sorte un suicide cellulaire. Bien que la mort apoptotique soit enclenchée dans de nombreuses circonstances, la suite d'événements morphologiques demeure toujours la même (figure 1.3). Morphologiquement, on observe un rétrécissement cellulaire, des boursofflements de la membrane plasmique, la condensation de la chromatine dans le noyau de la cellule, la fragmentation de l'ADN à des endroits spécifiques, la fragmentation de la cellule et la formation de petits corps apoptotiques (Kerr,1972). L'élimination des corps apoptotiques se fait par phagocytose, un mécanisme par lequel des cellules immunitaires de l'organisme, les macrophages, englobent et digèrent les déchets sans toutefois engendrer une réaction immunitaire (Stevens,2000).

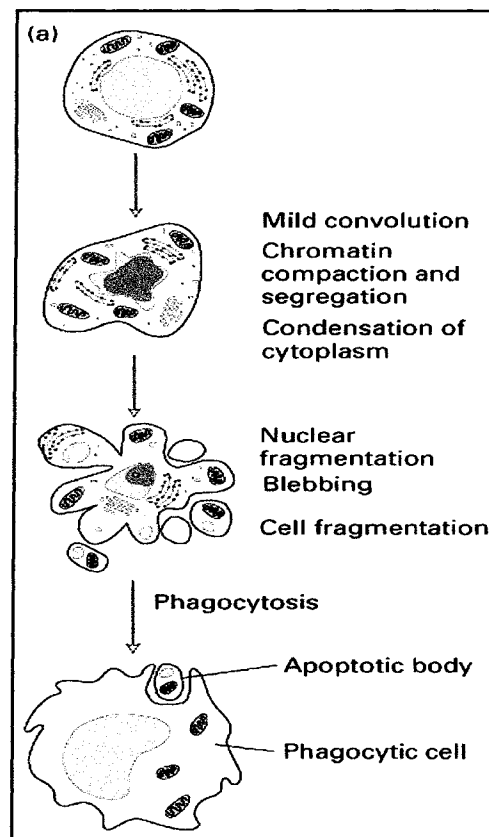


FIGURE 1.3 : Représentation schématique du mécanisme d'apoptose (Lodish,2000).

L'apoptose est enclenchée par différents signaux cellulaires, comme une carence en facteurs de croissance, l'activation de certains récepteurs membranaires par des ligands de mort cellulaire (le ligand Fas ou les facteurs de nécrose tumorale), l'activation de certains récepteurs nucléaires (glucocorticoïdes), des dommages membranaires ou à l'ADN (Stevens,2000). Ces signaux, lorsque interprétés par la cellule cible, enclencheront les mécanismes d'apoptose. L'apoptose peut se produire dans plusieurs situations. Par exemple, lors du développement embryonnaire, l'apoptose est nécessaire à la formation des doigts qui, au départ, ressemblent à des palmes. Les cellules de la palme entrent en apoptose donnant ainsi l'allure normale aux doigts (Stevens,2000). L'apoptose est également nécessaire au maintien de l'homéostasie permettant ainsi à l'organisme d'éliminer les cellules plus vieilles et de les remplacer par de nouvelles cellules (Stevens,2000). L'apoptose permet aussi l'élimination des cellules devenues nuisibles au fonctionnement normal de l'organisme évitant ainsi le développement de cancer (Stevens,2000). Donc, un problème au niveau

de la machinerie de l'apoptose constitue un élément contribuant à l'apparition d'un cancer.

L'apoptose est un phénomène fréquent au niveau de l'endomètre normal (Gosden,1997). En effet, les menstruations surviennent grâce au mécanisme d'apoptose (Bulletti,1998). Les cellules endométriales humaines, n'ayant pas reçu de signaux embryonnaires, entrent en apoptose permettant ainsi la desquamation de la couche fonctionnelle de l'endomètre qui est, à ce stade du cycle menstruel, remplie d'artères spiralées. Il y a alors menstruations et début d'un nouveau cycle menstruel.

1.2.1.1. Les caspases

Les effecteurs cellulaires de l'apoptose sont en fait des protéases qui contiennent des cystéines et qui sont spécifiques à l'aspartate, les caspases (pour "cysteine-containing aspartate-specific proteases"). Les caspases sont des protéines riches en cystéine qui ont la capacité, une fois activées, de cliver d'autres protéines cibles au niveau de leur résidu d'aspartate. Certaines caspases sont activées par des signaux d'activation émis par d'autres classes de protéines (Griffiths,2001), on les nomme alors les caspases initiateuses (caspase-2, -8, -9 et -10). Une fois activée, une caspase initiateuse va cliver, au niveau de leurs résidus d'aspartate, d'autres caspases, appelées caspases exécutrices (caspase-3, -6 et -7), engendrant ainsi une cascade de caspases (chaîne d'activation d'une caspase à une autre). Les caspases exécutrices procèdent à un clivage enzymatique des protéines cibles (figure 1.4). Parmi ces cibles, il y a, entre autre, la protéine séquestrant l'ADN endonucléase. Suite au clivage de cette protéine, l'ADN endonucléase peut alors procéder à la fragmentation de l'ADN. Les caspases exécutrices ont également comme cibles les protéines du cytosquelette, ce qui entraîne une perte de la forme normale de la cellule. Ces caspases agissent sur d'autres cibles conduisant à la rupture des organites et à la fragmentation de la cellule, donc à l'autodestruction de celle-ci (Griffiths,2001).

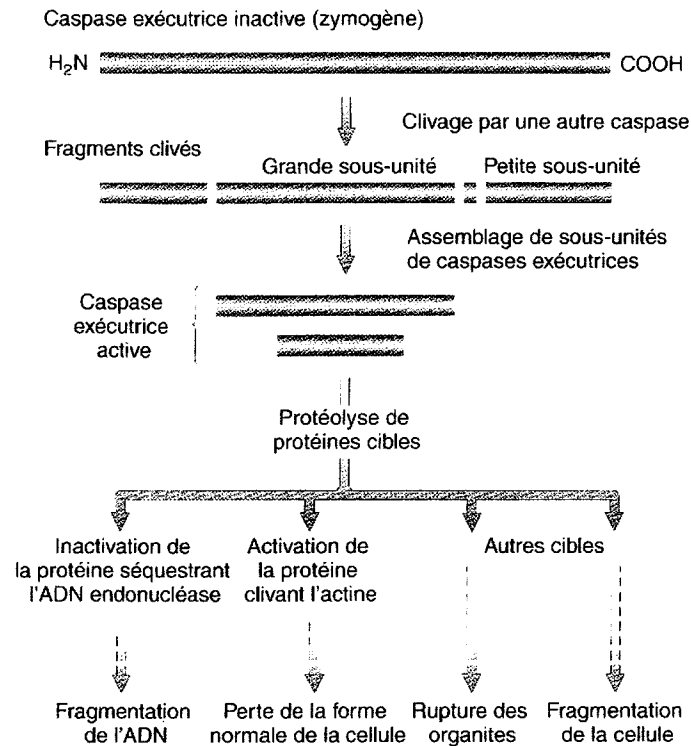


FIGURE 1.4 : Représentation schématique de l'activité des caspases (Griffiths,2001).

1.2.2. Autres morts cellulaires

Il existe d'autres types de mort cellulaire dont notamment la nécrose. La nécrose se différencie de l'apoptose par plusieurs caractéristiques. En effet, la nécrose est un processus de mort accidentelle qui peut survenir suite à une infection (ex. : bactérienne) ou à un stress quelconque (ex. : température). C'est un processus qui, contrairement à l'apoptose, provoque la mort de plusieurs cellules en même temps. On assiste alors à un gonflement de la cellule, une dégradation de l'ADN de manière non-spécifique, à une lyse membranaire et dissolution de son contenu, ce qui entraîne une forte réaction immunitaire à l'endroit de la nécrose (Okada,2004).

L'apoptose et la nécrose sont les deux types de mort cellulaire dont on entend le plus parler. La mort cellulaire peut également s'effectuer via d'autres mécanismes, dont l'autophagie et la catastrophe mitotique. L'autophagie est le processus par lequel

une cellule s'autodétruit via une dégradation cellulaire par ses lysosomes (Okada,2004). Ce mécanisme est indépendant des caspases, mais tout comme l'apoptose, c'est un suicide cellulaire programmé qui touche une seule cellule. La catastrophe mitotique est également un mécanisme de mort cellulaire programmée indépendante des caspases. Par contre, celle-ci se produit lorsqu'il y a erreur lors de la mitose. Morphologiquement, la catastrophe mitotique se décrit comme étant une énorme cellule multi-nucléée contenant de la chromatine non condensée (Okada,2004).

1.3. Les prostaglandines et les cyclooxygénases

Plusieurs gènes interviennent dans l'apparition et la propagation d'un cancer. Les produits des gènes des prostaglandines (PGs) et des cyclooxygénases (COXs) sont des éléments de la cellule impliqués dans sa survie et sa prolifération cellulaire, donc souvent surproduits dans les cellules cancéreuses (DuBois,1998).

1.3.1. Les prostaglandines

Les PGs sont des petites hormones lipophiles (masse moléculaire d'environ 350 g/mol) faisant partie, avec les thromboxanes (TXs) de la famille des eicosanoïdes (*eckos* = vingt; *oïde* = semblable à). Ces hormones sont dérivées de l'acide arachidonique, un acide gras de 20 carbones présent dans la membrane cellulaire. Suite à un clivage des phospholipides membranaires par une phospholipase, principalement la phospholipase A₂ (PLA₂), l'acide arachidonique est libéré dans la cellule. Ensuite, les enzymes COXs, via leur fonction oxydase, transforment l'acide arachidonique en prostaglandine G₂ (PGG₂), qui elle sera à son tour transformée par les COXs, via leur fonction peroxydase, en prostaglandine H₂ (PGH₂). Cette dernière servira de substrats pour la formation des autres PGs, telles la PGI₂, la PGD₂, la PGE₂ et la PGF₂α (figure 1.5), via différents prostaglandines synthases (PGS), dont la PGIS, PGDS, PGES et PGFS. La TXA₂ est, elle aussi formée à partir de la PGH₂, mais via la thromboxane synthase (TXS).

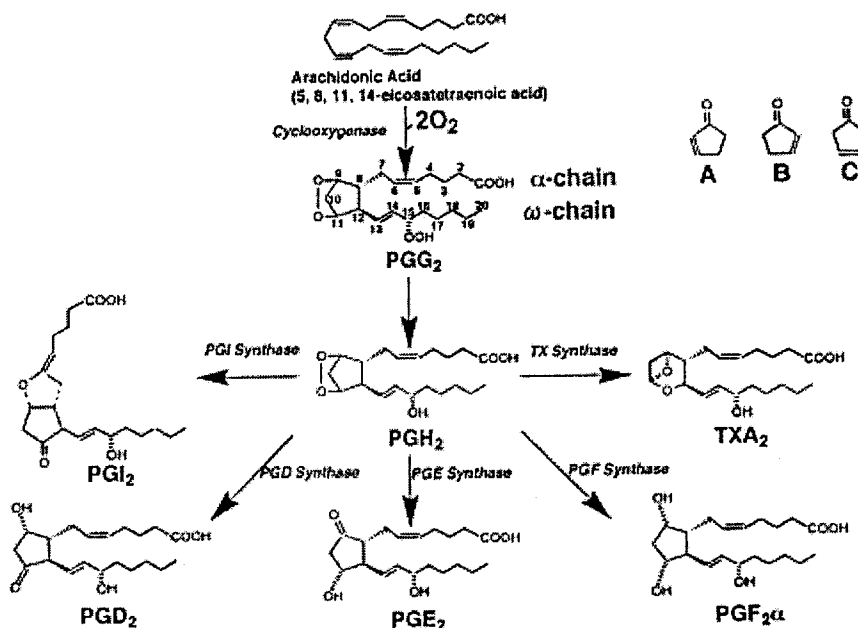


FIGURE 1.5 : Représentation schématique de la synthèse des prostaglandines et de la thromboxane A_2 à partir de l'acide arachidonique (Narumiya,1999).

Les PGs sont d'importantes hormones locales aux niveaux des différents systèmes physiologiques du corps humain. Elles peuvent agir de façon autocrine ou paracrine. Au niveau de l'endomètre humain, c'est la PGE_2 qui est plus abondante et la plus importante (Pickles,1965). Elle est produite par les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre (Lumsden,1984). Elle est impliquée dans le processus de déciduation permettant l'implantation de l'embryon (Ishihara,1986), dans l'initiation de l'accouchement chez la femme (MacDonald,1978) et dans le cycle menstruel (Singh,1975). Bien que d'un point de vue physiologique la PGE_2 soit très importante, elle possède également des propriétés pro-cancérogènes (figure 1.6) par l'activation des protéines de survie cellulaire AMPc, IP3, MAP-kinases et phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (Sales,2003). En effet, la PGE_2 induit l'angiogénèse (Sales,2002; Tsujii,1998), ce qui permet une augmentation de l'apport en sang et nutriment à la tumeur. Elle inhibe l'apoptose et augmente la prolifération cellulaire (Jabbour,2002; Jabbour,2003), elle augmente le potentiel métastatique des cellules (Okuno,1995; Tsujii,1997) et elle possède une action d'immunosuppression (DeWitt,1991; Halme,1988; Kelly,1995). La PGE_2 se retrouve dans le milieu extracellulaire en concentration allant de 3 à 12 pg/mL (Fitzpatrick,1980), mais elle est rapidement métabolisée par le foie en un métabolite

inactif, le 13, 14-dihydro-15-kéto PGE₂ (Hamberg,1971). Elle a une demi-vie très courte, soit 30 secondes (Fitzpatrick,1980), ce qui explique pourquoi la PGE₂ ne peut avoir une action systémique. Ceci est très important d'un point de vue physiologique car la PGE₂ peut agir à plusieurs endroits dans le corps humain. Par exemple, la PGE₂ est en partie responsable de la fièvre suite à son action sur l'hypothalamus antérieur (Blatteis,2005). L'action locale de cette PG empêche qu'il y ait fièvre à chaque fois que celle-ci est produite.

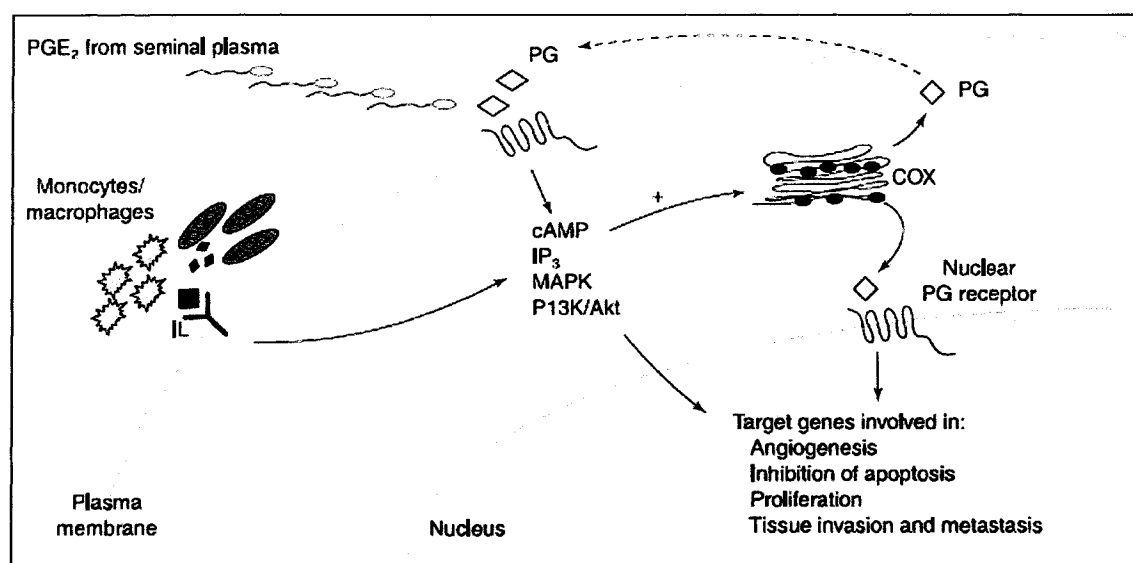


FIGURE 1.6 : Représentation schématique des rôles de la PGE₂ (Sales,2003).

1.3.2. Les cyclooxygénases

La COX est l'enzyme limitant de la transformation de l'acide arachidonique en PGs. Elle existe sous deux isoformes. La COX-1 est l'isoforme constitutive tandis que la COX-2 est l'isoforme induite suite à différents stimuli mitogéniques ou inflammatoires. Il a été démontré que la COX-1 est surexprimée dans différents cancers tel le cancer du sein (Hwang,1998), de la prostate (Kirschenbaum,2000) et du col utérin (Sales,2002) et qu'elle a un rôle dans la tumorigénèse (Chulada,2000; Narko,1997). La COX-2 peut elle aussi être surexprimée dans le cas du cancer du sein (Hwang,1998), de la prostate (Gupta,2000; Kirschenbaum,2000) et du col utérin (Kulkarni,2001). La présence de la

COX-1 et de la COX-2 a également été démontré dans le cancer de l'endomètre chez la femme (Uotila,2002). La COX-2, tout comme la COX-1, joue donc un rôle dans la tumorigénèse (Trifan,2003). L'inhibition des COXs pourrait donc représenter une bonne stratégie pour prévenir et vaincre le cancer (Subbaramaiah,1997).

1.3.3. Les récepteurs de la prostaglandine E₂

L'action de la PGE₂ se fait via l'activation de quatre récepteurs, nommés EP1, EP2, EP3 et EP4 (figure 1.7). Tous ces récepteurs sont couplés à une protéine G, mais induisent différents signaux intracellulaires et la transcription de différents gènes (Coleman,1994; Narumiya,1999). Le récepteur EP1, lorsqu'il est activé, induit une mobilisation du calcium intracellulaire et de l'inositol triphosphate (IP3) via une protéine Gq. Les récepteurs EP2 et EP4 ont une action similaire : ils augmentent la concentration interne d'adénosine 3',5'-monophosphate (AMP cyclique ou AMPc) via l'activation d'une protéine Gs. Le récepteur EP3 existe sous plusieurs isoformes et peut avoir des actions opposées (Namba,1993). Son action la plus fréquente est l'inhibition de l'adénylate cyclase via une protéine Gi entraînant une diminution de l'AMPc et ainsi, une diminution de la transcription de différents gènes. Le récepteur EP3 peut également, lorsqu'il est couplé à une protéine Gs, avoir une action positive sur l'AMPc ou, lorsqu'il est couplé à une protéine Gq, induire l'augmentation de calcium intracellulaire et l'accumulation d'IP3. Bien que la plupart des récepteurs à la PGE₂ soient membranaires (Sales,2003), certaines études ont démontré que des récepteurs EP3 et EP4 pouvaient parfois être présents sur la membrane nucléaire permettant ainsi une action plus rapide de la PGE₂ nouvellement produite (Bhattacharya,1998; Bhattacharya,1999). La coexpression de tous les sous-types des récepteurs à la PGE₂ dont les actions peuvent être opposées permet le maintien de l'homéostasie suite à une forte décharge de PGE₂ qui agit immédiatement de façon autocrine et paracrine (Ashby,1998).

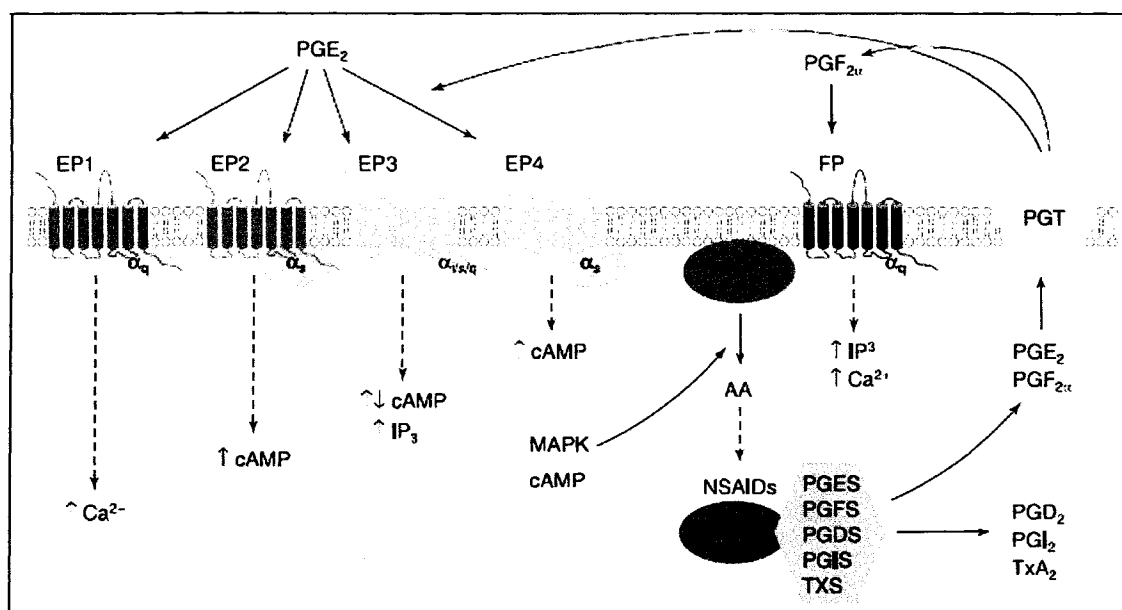


FIGURE 1.7 : Représentation schématique de l'activité des récepteurs à la PGE₂ (Sales,2003).

1.4. Le resvératrol

Au cours des dernières années, différents agents chimiothérapeutiques reconnus pour leur capacité à induire l'apoptose ont été étudiés dans le but de guérir les cancers utérins (Gagnon,2004b; Muggia,2004). La plupart de ces agents chimiothérapeutiques sont des molécules synthétiques, souvent très nocives pour les cellules normales du corps humain. Par contre, depuis quelques années, une molécule naturellement présente dans l'alimentation, le 3,4',5-trihydroxy-trans-stilbène (figure 1.8), plus communément appelé resvératrol, fait l'objet de plusieurs études (Langcake,1977; Yao,2004).

1.4.1. Caractéristiques

Le resvératrol est une phytoalexine, c'est-à-dire une substance que certaines espèces végétales synthétisent en réponse à un stress environnemental ou à une attaque d'un pathogène (Langcake,1977). On retrouve principalement le resvératrol dans la pelure des raisins rouges. Par conséquent, il est présent en concentrations variables dans différents vins rouges (Celotti,1996). La pelure d'un raisin frais peut contenir

entre 50 et 100 mg de resvératrol par gramme de pelure et dans le vin rouge, la concentration en resvératrol varie de 0,2 mg/l à 15 mg/l (environ 0,88- 65 μ M). Le resvératrol est aussi retrouvé, en plus faible quantité, dans les arachides et d'autres petits fruits tels les raisins verts, les mûres, les bleuets et les canneberges (Aggarwal,2004). Le resvératrol peut également exister sous une forme cis (3,4',5-trihydroxy-cis-stilbène), mais il est retrouvé en moins grande quantité dans le vin (Goldberg,1996). Le resvératrol fait aussi partie de la famille des phytoestrogènes étant donné que cette molécule provient d'une plante et qu'elle a une structure qui ressemble à celle de l'œstrogène synthétique, le diéthylstilbestrol (Gehm,1997) (figure 1.9). Il peut agir comme agoniste des récepteurs à l'œstrogène et ainsi induire la prolifération cellulaire, alors que parfois il induit une diminution de la prolifération cellulaire en agissant comme anti-œstrogène (Bhat,2001a; Bowers,2000).

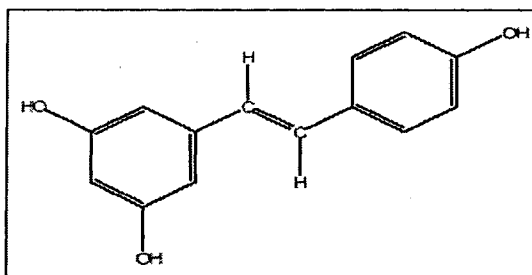


FIGURE 1.8 : Représentation schématique de la structure chimique du resvératrol.

1.4.2. Modes d'actions

Des études suggèrent qu'une consommation régulière et modérée de vin rouge peut avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine (Fremont,2000; Yao,2004), alors que les autres boissons alcoolisées auraient des effets plus néfastes (Driver,1987; Thomas,1995). La majorité des études effectuées avec le resvératrol ont été réalisées au niveau du système cardiovasculaire. En fait, les chercheurs ont tenté d'expliquer ce que l'on nomme aujourd'hui le paradoxe français. En effet, les habitants de la France boivent régulièrement du vin rouge et le taux de maladies cardiaques est moins élevé et ce, malgré une diète très riche en aliments gras de source animale. Les chercheurs ont découvert que le vin rouge contient beaucoup de substances phénoliques qui sont de

puissants antioxydants faisant la lutte au mauvais cholestérol (LDL ou "Low density lipoprotein"), ce dernier étant impliqué dans la formation de plaque d'athérome et étant à l'origine de nombreuses attaques cardiaques fatales (Frankel,1993). On sait maintenant que le resvératrol a aussi un effet cardio-protecteur de par sa capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire (Pace-Asciak,1995). Ceci permet de diminuer la formation d'agrégat pouvant aboutir à la formation d'un caillot ou thrombus qui obstruerait les vaisseaux provoquant ainsi un arrêt cardiaque. Le resvératrol a également une activité anti-inflammatoire au niveau du système cardio-vasculaire en permettant l'inhibition de la synthèse et de la sécrétion de l'oxyde nitrique synthase et de la COX-2, des médiateurs de l'inflammation (de la Lastra,2005).

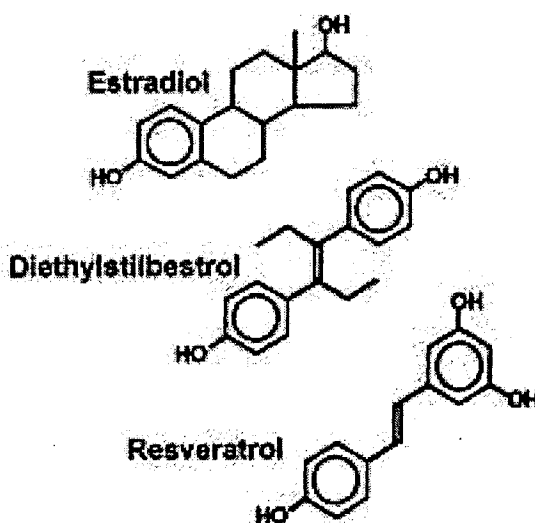


FIGURE 1.9 : Schéma comparatif de la structure chimique de l'œstrogène ("estradiol"), de l'œstrogène synthétique (le diéthylstilbestrol) et du resvératrol (Gehm,1997).

Vers la fin des années 1990, des études effectuées à plusieurs endroits dans le monde, notamment en Allemagne, aux États-Unis et en Chine, ont démontré qu'une consommation régulière et modérée en vin rouge contribuait non seulement à diminuer la mortalité causée par les maladies cardio-vasculaires, mais aussi la mortalité totale de la population (Keil,1997; Peele,1997; Yuan,1997). C'est à ce moment que les chercheurs ont commencé à étudier les actions des composants du vin rouge, surtout le resvératrol, sur différentes pathologies. Les chercheurs ont alors trouvé que le

resvératrol, grâce son activité anti-oxydante, aurait un effet protecteur sur les cellules neuronales (Tredici,1999) et préviendrait donc les maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer (Draczynska-Lusiak,1998; Tredici,1999). Au cours des dernières années, c'est plutôt le rôle du resvératrol comme agent anticancéreux qui a fait l'objet de plus d'étude. C'est l'équipe de Jang *et al.* (1997) qui fut la première à proposer que le resvératrol pouvait avoir un effet anti-cancer. En effet, ils ont démontré que le resvératrol a la capacité d'interférer avec des événements cellulaires associés à l'initiation, la promotion et la progression des multiples étapes de la carcinogénèse. Suite à cette étude, des travaux ont été effectués sur différents types de cancers et des propriétés anti-cancers du resvératrol ont été démontrées notamment au niveau du cancer du sein (Mgbonyebi,1998), oral (ElAttar,1999), de la prostate (Hsieh,1999), du colon (Mutoh,2000), du foie (Delmas,2000) et des leucémies (Clement,1998). Les effets du resvératrol au niveau des cancers utérins ont été très peu étudiés.

Il existe, à ce jour, seulement deux études sur les effets du resvératrol au niveau du cancer de l'endomètre humain. Récemment, les chercheurs Bath et Pezzuto (2001b) démontrèrent pour la première fois que le resvératrol peut agir en temps qu'anti-œstrogène sur une lignée cancéreuse de l'endomètre humain par la régulation négative du récepteur ER- α à l'œstrogène. Ainsi, les récepteurs à l'œstrogène étant présents en moins grande quantité, une plus petite quantité d'œstrogène pourra aller se fixer et la prolifération cellulaire sera diminuée. Une autre équipe a également démontré que le resvératrol peut inhiber la croissance cellulaire, mais a proposé un mécanisme impliquant la régulation négative du gène du facteur de croissance épithélial, EGF (Kaneuchi,2003). Le produit de gène de croissance épithélial a comme fonction d'induire la prolifération cellulaire des cellules épithéliales, dont les cellules épithéliales de l'endomètre (Smith,1989). Une régulation négative de ce gène entraîne donc une inhibition de la prolifération cellulaire. Ces deux études ont été effectuées sur une seule lignée cancéreuse endométriale humaine, la lignée Ishikawa. Il est donc impossible d'appliquer ces conclusions à d'autres lignées cancéreuses de l'endomètre.

2. Objectifs

Sachant que les COXs et la PGE₂ sont des éléments impliqués dans le cancer endométrial humain (DuBois,1998), nous avons voulu en premier lieu, caractériser la présence des deux isoformes de la COX et des quatre isoformes du récepteur à la PGE₂ chez les six lignées cancéreuses étudiées, soit cinq lignées cancéreuses de l'endomètre humain (HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa et TOV-1078D) et sur une lignée cancéreuse du col utérin humain (HeLa). Considérant l'activité anti-cancérigène du resvératrol (Jang,1997), nous avons ensuite comme second objectif de déterminer l'effet du resvératrol au niveau de la prolifération cellulaire, de la mort cellulaire apoptotique et de la production en PGE₂ chez les six lignées cancéreuses utérines étudiées. Pour la toute première fois, une étude sur les effets du resvératrol au niveau du cancer endométrial humain a été effectuée sur plus d'une lignée cancéreuse de l'endomètre. Finalement, le troisième objectif était de déterminer la ou les cibles cellulaires du resvératrol dans l'endomètre humain.

CHAPITRE II
EFFECT OF RESVERATROL ON CELL SURVIVAL AND APOPTOSIS OF
HUMAN ENDOMETRIAL CANCER CELLS

Résumé

En occident, le cancer endométrial humain est le quatrième cancer en incidence chez la femme, mais il est le cancer gynécologique le plus fréquent. La cyclooxygénase-1 et -2 (COX-1 et -2) sont les enzymes limitant de la transformation de l'acide arachidonique, un acide gras présent dans les membranes cellulaires, en prostaglandines (PGs). Ces dernières, plus particulièrement la prostaglandine E₂ (PGE₂), sont des éléments clés dans l'évolution et la transformation d'une tumeur. L'action de la PGE₂ se fait via quatre récepteurs : EP1, EP2, EP3 et EP4. L'objectif de cette étude est de déterminer si le resvératrol, un antioxydant présent dans le vin rouge, pourrait influencer la production de PGE₂ et entraîner la mort ou la prolifération cellulaire de six lignées cancéreuses gynécologiques humaines (HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa et TOV-1078D). Pour chaque lignée, du RT-PCR quantitatif en temps réel a été effectué afin de mesurer les taux des ARNm des COX-1 et -2 et des quatre récepteurs EP. Des analyses Western blots ont été effectuées afin de mesurer le taux d'expression protéique de la COX-1 et -2. Les résultats indiquent que chaque lignée cellulaire exprime à différents niveaux les deux isoformes de la COX et les quatre récepteurs EP. Suite à des tests de prolifération cellulaire au MTT, nos résultats indiquent que le resvératrol tend à induire une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses étudiées et ce, de manière dose et temps dépendant, mais variable selon la lignée cellulaire. Différentes méthodes de détection de l'apoptose indiquent que le resvératrol induit l'apoptose à fortes doses chez les cellules HeLa, HEC-1-A, Ishikawa, RL-95-2 et TOV-1078D alors que les cellules KLE demeurent résistantes. En réponse au resvératrol, la sécrétion de PGE₂ diminue chez toutes les lignées cellulaires qui expriment COX-1 et/ou COX-2. Différentes cibles cellulaires telles que la PI3-kinase, PKA, PKC, MEK-1 et p38 MAPK ont été investiguées. L'inhibition de ces cibles n'a pas influencé l'action du resvératrol. En conclusion, le resvératrol induit l'apoptose chez cinq de six lignées cellulaires étudiées possiblement via l'inhibition de l'activité enzymatique des COXs et via un ou plusieurs autres mécanismes toujours inconnus.

Effect of resveratrol on cell survival and apoptosis of human endometrial cancer cells[†]

Émilie Sexton, Kim Leblanc, Sophie Parent, Pascal Lemoine and Eric Asselin*

Département de Chimie-Biologie, Groupe de Recherche en Biopathologies Cellulaires et Moléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Short title: Effect of resveratrol on endometrial cells.

Key words: Apoptosis, cell survival, caspases, endometrium, prostaglandins, COX.

*Corresponding Author: Eric Asselin, Ph.D.
Département de Chimie-Biologie
Section Biologie Médicale
Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7
E-mail: Eric_Asselin@uqtr.ca
FAX: (819) 376-5084

[†] This work has been supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research of Canada (CIHR). Eric Asselin is a chercheur-boursier from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and recipient of a New Investigator award of the CIHR. Émilie Sexton and Kim Leblanc are recipients of NSERC and CIHR studentships respectively.

Abstract

In the Western world, endometrial cancer is the most common gynecological cancer and the fourth most prominent among all feminine cancers. Cyclooxygenase-1 and -2 (COX-1 and -2) are the limiting enzymes that catalyze the synthesis of prostaglandins (PGs) from arachidonic acid. The PGs, particularly PGE₂, have been shown to be implicated in evolution and tumor transformation. Four prostaglandin E₂ receptors have been found: EP1, EP2, EP3 and EP4. The aim of this study was to determine if resveratrol, a natural anti-oxidant found in red wine, could influence the production of PGE₂ and apoptotic cell death or cellular proliferation. Six different human uterine cancer cell lines were used for this study (HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D). Real-time RT-PCR was carried out to measure COX-1, COX-2, EP1, EP2, EP3 and EP4 mRNA expression and Western blot analyses were carried out to measure COX-1 and COX-2 protein expression. The results indicated that all cell lines expressed both COX isoforms and the four EP receptors at different levels. In the second set of experiment, cells were treated with various concentrations of resveratrol for different lengths of time. MTT proliferation assay revealed that the effect of resveratrol was biphasic: cell proliferation was increased at low concentration (3.125-12 μ M) whereas higher concentrations (50-100 μ M) resulted in a decrease of cell proliferation in a time dependant manner. Resveratrol induced apoptosis in HeLa, HEC-1-A, Ishikawa, RL-95-2 cells and TOV-1078D cells but not in KLE cells. In response to resveratrol, PGE₂ secretion was decreased in all cell lines that expressed COX-1 or COX-2. Different targets such as the PI3-kinase, PKA, PKC, MEK-1 and p38 Mapk were investigated using specific inhibitors. Inhibition of these pathways did not influence resveratrol activity. In conclusion, resveratrol induced apoptosis on five of the six cell lines studied by possible inhibition of COX activity and other signaling pathways that are yet to be discovered.

Introduction

Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene) is a natural phytoalexin synthesized by different plants in response to fungal infection (Langcake,1977). Resveratrol is present in grape skins and consequently, in red wines and grape juices (Celotti,1996; Faustino,2003). Many studies have demonstrated that resveratrol can reduce the risk of coronary heart disease by inhibiting polymorphonuclear leukocyte function (Rotondo,1998). Other studies have showed that resveratrol possesses an antioxidant activity (Fauconneau,1997) and can inhibits platelet aggregation (Orsini,1997). More recently, it was demonstrated for the first time, that resveratrol possesses cancer chemopreventive activity by interfering with different cellular events associated with initiation, promotion and progression of multi-stage carcinogenesis (Jang,1997). Then, several studies showed the chemopreventive activity of resveratrol in different types of cancer, such as breast cancer (Mgbonyebi,1998), prostate cancer (Hsieh,1999) and colon cancer (Schneider,2000).

Cyclooxygenase (COX) is the rate-limiting enzyme involved in the biosynthesis of prostaglandins (PGs) and exists in two isoforms: COX-1 (constitutively expressed) and COX-2 (the regulated form). It has been shown that COX-1 is up-regulated in different carcinoma (Hwang,1998; Kirschenbaum,2000; Sales,2002)and play a role in tumorigenesis (Chulada,2000; Narko,1997). COX-2 up-regulation has been found in several types of cancers such as cervix (Kulkarni,2001), prostate (Gupta,2000) and breast (Howe,2001). Thus, COX-2, as well as COX-1, play a role in tumorigenesis (Ristimaki,2002; Trifan,2003).

PGE₂, present in human endometrium (Pickles,1965), is responsible for decidualization processes occurring at the time of human embryo implantation (Ishihara,1986) and implicated in initiation of parturition in the human female (MacDonald,1978). In physiologic situations, PGE₂ is present in human endometrium during the menstrual cycle (Singh,1975). PGE₂ exerts its biological function through interaction with the G protein-coupled receptors present in the human endometrium (Hofmann,1985), namely

EP1, EP2, EP3 and EP4. The EP1 receptor activates phospholipase C and the mobilization of the inositol triphosphate pathway, the EP2 receptor, like the EP4 receptor, is coupled to the adenylate cyclase and activates the cAMP/protein kinase A pathway, and the EP3 receptor inhibits adenylate cyclase and activates the phospholipase C (Coleman,1994).

It is believed that COX over-expression and the PGs synthesis, particularly PGE₂, may be key elements in the evolution of tumor transformation and malignancy in different cancers, by increasing cellular proliferation and resistance to apoptosis of epithelial cells (Gupta,2000; Jabbour,2003; Sales,2002; Sales,2003). Studies suggest that resveratrol acts as an NSAID by inhibiting COX-2 transcription and activity (Murias,2004; Mutoh,2000), but recently, Szewczuk et al. showed that resveratrol inhibits the enzymatic activity of COX-1 but not the activity of COX-2 (Szewczuk,2004b; Szewczuk,2004a; Szewczuk,2005).

The present study was undertaken on six different uterine cancer cell lines to determine if resveratrol might influence cellular proliferation, apoptosis and PGE₂ production, and to determine its cellular target. We hypothesized that resveratrol can induce a decrease in cellular proliferation and PGE₂ production and an increase of apoptosis in uterine cell lines. Our results show that resveratrol induces apoptosis on five of the six cell lines studied by inhibiting COX activity.

Materials and methods

Reagents. Resveratrol, SB 203580, KT 5720, Chelerythrine Chloride, NS-398, MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphephenyltetrazolium bromide) and Hoechst 33258 were obtained from Sigma (St. Louis, MO). LY294002 and PD 98059 were obtained from Cell Signaling (Beverly, MA). Prostaglandin E₂ was obtained from Cayman Chemical (Ann Harbor, MI). DMEM-F12, Mc Coy's PCR primers, FBS and GBS serum were purchased from Invitrogen (Burlington, ON). Cleaved caspase-3 antibodies were obtained from New England Biolabs (Mississauga, ON) and anti-human COX-1 and

COX-2 GAPDH were obtained from Cedarlane Laboratories (Hornby, ON). CDC47/MCM7 antibody was obtained from Mediacorp (Montréal, QC). Secondary horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit antibody and secondary horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse antibody were purchased from BioRad (Mississauga, ON).

MTT proliferation assay. Cells were plated at a density of 2×10^4 cells/well in 96-well plates 24 hours before the assay. Cells were cultured for 24, 48 and 72 hours in the presence of different concentrations of Resveratrol (0; 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50 and 100 μ M in 0,1 % DMSO). At the end of the culture period, 10 μ l of MTT (5 mg/ml) was added to each well. After 3.5 hours of incubation with MTT, 100 μ l of solubilization solution was added (10% SDS in 0.01M HCl) and the microplate was incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The OD was read with Microplate Manager (ELISA) between 550 and 600 nm. MTT was also performed with Resveratrol (0; 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50 and 100 μ M in 0,1 % DMSO) in the presence or absence of 5 μ M (0,05% DMSO) of LY294002 (PI3-K inhibitor), NS-398 (COX-2 inhibitor), SB 203580 (p38 Mapk inhibitor), PD 98059 (MEK-1 inhibitor), KT 5720 (PKA inhibitor) and Chelerythrine chloride (PKC inhibitor) for 48 hours. MTT was also performed with PGE₂ (0, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M in 0,1% DMSO) in the presence or absence of resveratrol (10 and 100 μ M in 0,1 % DMSO).

Resveratrol treatment. HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells were plated at a density of 1×10^6 cells/dish (100mm X 20mm) 24 hours before treatment. Cells were treated for 48 hours with resveratrol (0, 10 and 100 μ M).

Protein extraction and Western analysis. Cells (both floating and attached) were trypsinized, lysed in lysis buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)), frozen at -20°C and thawed three times, and centrifuged (13000 X g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. Supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50

µg) were heated (95°C, 3 min), resolved by 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electro-transferred to nitrocellulose membranes (15 V, 30 min) using a semi-dry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). Membranes were then blocked (1 hour, RT) with PBS containing 5% milk powder, then incubated with anti-COX-1 (1:2 500), anti-COX-2 (1:2 000), anti-CDC47 (1:16 000), anti-cleaved caspase-3 (1:1 500) or anti-GAPDH (1:50 000) antibody (overnight, 4°C), and subsequently with Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:3 000; RT, 45 min) for the anti-cleaved caspase-3 antibody or with HRP-conjugated anti-Mouse secondary antibody (1:3 000, RT, 45 min) for the anti-COX-1, anti-COX-2 and anti-CDC47 and HRP-conjugated anti-Mouse secondary antibody (1:60 000, RT, 45 min) for anti-GAPDH antibody. Peroxidase activity was visualized with the WestSuper Femto (Pierce), according to the manufacturer's instructions.

Hoechst staining. Following treatment, both floating and attached cells were resuspended in PBS containing Hoechst 33258 for 24 hours and stored at 4°C. Hoechst nuclear staining was viewed and photographed using a Olympus BX60 fluorescence microscope and a Coolsnap-Pro CF digital Camera (Carsen Group, ON). Cells with typical apoptotic nuclear morphology (nuclear shrinkage, condensation and fragmentation) were identified and counted, using randomly selected fields on numbered photographic slides, of which the "counter" was not aware of the treatment, so as to avoid experimental bias. A minimum of 200 cells per treatment group were counted in each experiment and results are presented as a percentage of apoptotic cells.

DNA Fragmentation Assay for Apoptosis Detection. Pelleted cells ($1-5 \times 10^6$) were lysed in 500µl of detergent buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 5mM EDTA pH8.0 and 0.2% Triton X-100), vortexed vigorously and incubated 30 min. on ice. Fragmented DNA was separated from intact chromatin by centrifugation at 16,500xg for 30 min. at 4°C. Supernatants were divided into two 250µl fractions and 50µl of ice-cold 5M NaCl was added followed by vortexing. After extracting twice with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1), the DNA was precipitated overnight at -20°C with 2 vol. of EtOH and 1/10 vol. of 3M Sodium acetate pH5.2. The DNA pellets

were recovered by centrifugation at 16,500xg for 20 min at 4 °C, washed with EtOH 75% and air-dried. The DNA was dissolved by adding 50µl of TE pH8.0 containing 1.25µl of DNase-free RNase A 10mg/ml and incubated 30min at 37 °C. Fractions were pooled and purified DNA was loaded on a standard 1.2% agarose gel containing 0.5X SYBR Safe DNA stain. The DNA markers were used in parallel and electrophoresis run in Tris-borate EDTA buffer at 75V for 90 min. At the end of the electrophoresis, the DNA was visualized with an UV transilluminator.

Quantitative real-time RT-PCR analyses. In order to measure the abundance of COX-1, COX-2, EP1, EP2, EP3 and EP4 mRNA, primers were chosen as described below and tested with different primer concentrations and different cycles to avoid mRNA amplification near plateau and saturation. Total RNA (0.2 µg/µl) was used for preparation of first strand cDNA by reverse transcriptase (RT). The RNA samples were incubated (65°C, 10 min) with 2µl oligo dT (deoxythymidine) primers in a final volume of 10µl. Samples were then incubated (37°C, 60 min) in 20µl of a reaction buffer (1X) containing dithiothreitol (DTT; 100 mM), deoxynucleotide triphosphates (dNTPs; 5 mM) and Muloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT; 10 U). After cDNA synthesis, the reaction volumes were brought up to 60µl with autoclaved water. A negative control was also included, using the same reaction mixture but without RNA to ensure absence of any contaminating genomic DNA in the RNA template.

Human COX-1 mRNA was amplified using sense primer 5'-GCAACTGCTTCTTCCCTTTG-3' and antisense primer 5'-GGAGTTTGTCAATGCCACCT-3' and human COX-2 mRNA, was amplified using 5'-TGCTTGTCTGGACAACTGC-3' (sense) and 5'-TGAGCATCTACGGTTTGCTG-3' (antisense). For human EP1 mRNA, primers sequences were 5'-TTGTCGGTATCATGGTGGTG-3' (sens) and 5'-ATGTACACCCAAGGGTCCAG-3' (anti-sens), human EP2 mRNA, primers sequences were 5'-TGCTTCTCATGGTCTCGGTG-3' (sens) and 3'-GTGAAAGGCAAGGAGCAGAC-3' (anti-sens), human EP3 mRNA, primers sequences were 5'-CAACCTTTTCTTCGCCTCTG-3' (sens) and 5'-TTTCTGCTTCTCCGTGTGTG-3'

(anti-sens) and human EP4 mRNA, primers sequences were 5'-GACCTGTTGGGCACTTTGTT-3' (sens) and 5'-TGGACGCATAGACTGCAAAG-3' (anti-sens). Each reaction mixture (final volume, 20 μ l) contained RT template or negative control (2 μ l), primers (10 μ M) and Quantitect SYBRGreen Master Mix (10 μ l). Each PCR reaction was inserted in a LightCycler capillary. The quantitative PCR cycling conditions (55 cycles) chosen were (1) 15s at 94°C; (2) 20s at 65°C (COX-1), 63°C (COX-2), 59°C (EP1), 60°C (EP2), 60°C (EP3) and 60°C (EP4); and (3) 11sec (COX-1), 14sec (COX-2), 10sec (EP1), 12sec (EP2), 15sec (EP3) and 13sec (EP4) at 72°C. A melting curve was generated for each reaction and the conditions were (1) 95°C, (2) 30sec at the annealing temperature, and (3) temperature up to 95°C (0.2°C/sec). Finally, the cDNA concentration of each reaction was determined quantitatively using a standard curve. GAPDH was used as the control reaction.

PGE₂ enzyme immunoassay. The procedures for PGE₂ EIA kit (Cayman) described by the manufacturer was followed. Briefly, a 50- μ l aliquot from culture medium obtained during experimentation was used for PGE₂ determination in a 96-well plate coated with goat anti-rabbit secondary antibody. A volume of 50 μ l of PGE₂ tracer and 50 μ l of the PGE₂ antibody were added to each sample and the plates were incubated overnight at 4°C. Wells were washed with 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing Tween 20 (0,05%) at pH 7.4 ; 200 μ l of Ellman's reagent (69 mM acetylthiocholine and 54 mM 5,5'-dithio-bis[2-nitrobenzoic acid] in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) was added to each well, and samples were incubated in the dark at room temperature. This allows the bound enzyme tracer to react with Ellman's reagent to yield a yellow solution that can be measured photometrically with a microplate reader at 410 nm. A standard curve was developed simultaneously with standards ranging from 50 to 1000 pg/ml PGE₂. The presence of PGE₂ was undetectable in the culture media in the absence of cells.

Statistical analysis. All experiments were repeated at least six times. Data were subjected to one-way ANOVA or student t test (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

Results

Expression of mRNA genes and protein production. To determine basal levels of COX-1, COX-2, EP1, EP2, EP3 and EP4 mRNAs in uterine cancer cells, quantitative real-time RT-PCR studies have been carried out using specific primers chosen from human DNA sequences and amplified with the aid of the LightCycler (Roche). The presence of COX-1 and COX-2 was observed at different levels in all cell lines studied. COX-1 was strongly expressed in HEC-1-A cells (HEC-1-A > HeLa > Ishikawa > KLE = TOV-1078D > RL-95-2) and COX-2 was strongly expressed in HeLa cells (HeLa > Ishikawa > HEC-1-A = KLE = RL-95-2 = TOV-1078D) (Fig. 2.1). To confirm the results obtained at the mRNA level, Western blot analyses were carried out and showed that COX-1 protein was present in HeLa, HEC-1-A and Ishikawa cells (HEC-1-A > HeLa > Ishikawa) and COX-2 protein was present in HeLa, RL-95-2 and Ishikawa cells (HeLa > Ishikawa > RL-95-2). EP1 and EP2 mRNA were expressed in all cell lines but EP1 was more expressed in HEC-1-A cells and EP2 was more expressed in HeLa cells (Fig. 2.2). The expression level of EP3 mRNA was high in Ishikawa cell line compared with the five other cancer cell lines tested. RL-95-2 cells expressed high levels of EP4 and HEC-1-A expressed low levels of EP4 compared with all cell lines tested.

Resveratrol decreases cell proliferation. To determine the effect of resveratrol, endometrial and cervical cancer cells were treated with different concentrations of this natural compound (Fig. 2.3). The effect of resveratrol was biphasic: cell proliferation was increased at low concentration (3.125-12 μ M) whereas higher concentrations (50-100 μ M) resulted in a decrease of cell proliferation in a time dependant manner. Western blot analysis with CDC47 antibody (a cellular proliferation marker) was performed after a 48 hour treatment of resveratrol, and results demonstrated a significantly reduction of CDC47 only in HeLa, Ishikawa and TOV-1078D cells at 100 μ M (Fig. 2.6). Resveratrol had no significant effect on CDC47 expression in the three other cell lines studied.

Resveratrol influences PGE₂ production and its action. To determine the effect of resveratrol on PGE₂ production, uterine cell lines were treated with three different doses (0, 10 and 100 μ M) of resveratrol. Resveratrol decreases PGE₂ production in a dose dependant manner in HeLa and HEC-1-A cells, two cell lines that produced a higher level of PGE₂ (Fig. 2.4). In RL-95-2 and Ishikawa cells, resveratrol induces a significantly diminution of PGE₂ only at 100 μ M. KLE and TOV-1078D cells produced low level of PGE₂ and resveratrol did not influenced PGE₂ production.

Resveratrol induces apoptosis. To test if resveratrol can induce apoptosis in uterine cancer, different methods of apoptosis detection were used. After a 48 hours treatment, resveratrol weakly induced apoptosis in two cell lines studied, HEC-1-A and RL-95-2, as demonstrated by Hoescht analysis (Fig. 2.5A). In HeLa, Ishikawa and TOV-1078D, 100 μ M of resveratrol significantly induced apoptosis (55%, 50% and 45% respectively). KLE cells were resistant to a resveratrol treatment. Typical DNA fragmentation was observed in resveratrol-treated HeLa, HEC-1-A, Ishikawa and TOV-1078D cells. An example is showed in Fig. 2.5B. Resveratrol did not induce apoptosis in KLE cells. Western blot analyses using cleaved caspase-3 antibody were performed on uterine cell lines studied after a 48 hours treatment of resveratrol. Results demonstrated a significant increase of cleaved caspase-3 level at 10 and 100 μ M in HEC-1-A cells and at 100 μ M in HeLa, Ishikawa and TOV-1078 cells (Fig. 2.6). Cleaved caspase-3 was not regulated in KLE and RL-95-2 cells.

Target of resveratrol. As showed previously, resveratrol induces cell proliferation at low concentrations and cell proliferation decreases at high concentrations. MTT assay was performed after treatment with resveratrol in the presence or absence of different inhibitors for a period of 48 hours. LY294002 (PI 3-kinase inhibitor) inhibited cellular proliferation in all cell lines studied and NS-398 (COX-2 inhibitor) inhibited cellular proliferation in RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D. NS-398 treatment did not block the action of the resveratrol on cell proliferation (Fig. 2.7). KT 5720 (PKA inhibitor), chelerythrine chloride (PKC inhibitor), PD 98059 (MEK-1 inhibitor) and SB 203580

(p38 MAPK inhibitor) did not block the action of resveratrol in the six cell lines studied (Fig. 2.8).

PGE₂ did not affect resveratrol activity. Ishikawa and TOV-1078D cells were treated with different concentrations of PGE₂ for a period of 48 hours in the absence or presence of resveratrol (10 and 100 μ M). At 10 μ M, resveratrol, in the presence of different concentrations of PGE₂, decreased cellular proliferation in Ishikawa and increased cellular proliferation in TOV-1078D cells (Fig. 2.9). At 100 μ M, resveratrol inhibited cellular proliferation in the two cell lines studied. PGE₂ did not induce cellular proliferation on these two cell lines, but cellular proliferation was reduced at 10^{-4} M. Resveratrol had the same effect with or without PGE₂.

Discussion

Even though resveratrol is already known for its benefits on the cardiovascular system (Pace-Asciak,1995; Pendurthi,1999), its antioxidant effects on neurodegenerative diseases (De Ruvo,2000) and for its anticancer effects (Hsieh,1999; Mgbonyebi,1998; Schneider,2000), this natural molecule is being more and more studied for its health benefits in other areas, such as cancer. However, little is known about its effects on uterine cancer. To date, only two studies have been carried out on the effects of resveratrol on human endometrial cancer. In 2001, the Bath and al. team proved for the first time that resveratrol acted as an anti-estrogen by down regulating the estrogen receptor- α (ER- α), thus allowing a cytostatic activity on the endometrial cells (Bhat,2001). Another team also proved that resveratrol inhibited the cell growth of endometrial cancer cells but proposed a mechanism via the down regulation of the epithelial growth factor gene (EGF) (Bhat,2001). Both studies were carried out only on the Ishikawa human endometrial cancer cells. We have decided to study the effects of resveratrol on five cancer lines of the human endometrium (HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D) and on a cancer line of the human uterine cervix (HeLa). One of the most studied effects of resveratrol is its capacity to inhibit the COX (Subbaramaiah,1998; Szewczuk,2004a). Given that the hormone PGE₂, consequently

the COX enzymes, is present in a large quantity in the human uterus (Pickles,1965) and that it has very important effects such as its implication in the process of “decidualisation” permitting the embryo implantation (Ishihara,1986), its implication in the initiation of childbirth (MacDonald,1978) and its implication during the menstrual cycle (Singh,1975), the uterus is thus a potential target of resveratrol. Given that resveratrol, a phytoestrogen, has the capacity to bind itself to the ER- α (Bhat,2001), and given the important presence of this receptor at the normal and neoplastic endometrium level (Prodi,1979), the uterus is yet again a potential target of resveratrol.

Following resveratrol treatments, we have showed that in the cells expressing COX-1 and/or COX-2, resveratrol induced a diminution of PGE₂ production. Although resveratrol did not act at the expression level of COX-1 and COX-2 proteins on the uterine cancer studied (results not presented), as suggested by many studies using different systems (Kundu,2004; Martinez,2000; Mutoh,2000; Subbaramaiah,1998; Subbaramaiah,1999), this diminution in the production of PGE₂ suggests rather an effect at the level of COX activity. As the Szewczuk and al. team has shown (2004a), resveratrol had an effect at the enzymatic activity level of COX-1, which agrees with our results, since the resveratrol induced a diminution of the production of PGE₂ in all cell lines expressing COX-1 (HeLa, HEC-1-A or Ishikawa). However, in RL-95-2, which expressed COX-2 and did not express the COX-1, resveratrol induced a diminution in the production of PGE₂. This leads us to believe that resveratrol can have an effect on a target other than the COX-1 protein. One of the studies proposing the effect of resveratrol at the transcription level of the COX-2 also proposed an effect of this molecule at the level of COX-2 activity in breast cancer (Subbaramaiah,1998), corresponding with our results since all the lines expressing the COX-2 (HeLa, RL-95-2 and Ishikawa) have seen their PGE₂ levels decreased following a resveratrol treatment. KLE and TOV-1078D cells, not expressing the COX have seen their PGE₂ levels unchanged following a resveratrol treatment. These results suggest that the resveratrol would have an effect on the activity of COX-1 and COX-2 activity. To verify if the combination with a COX inhibitor could increase the effect of resveratrol, cellular

proliferation assays were carried out with a combination NS-398, a COX-2 inhibitor, and resveratrol. In the absence of resveratrol, NS-398 should have inhibited cell proliferation in all the cells expressing COX-2, however, it inhibited cell proliferation in only two of the three lines expressing COX-2 (RL-95-2 and Ishikawa) but did not reduce cell proliferation of HeLa cells. The Sales and al. team explains this by the fact that the overexpression of COX-1 in HeLa cells increased COX-2 expression and PGE₂ receptors which modulates AMPc and angiogenic factors such as Ang-1 and Ang-2 (Sales,2002), therefore in spite of the inhibition of COX-2, other mechanisms compensate for this action. NS-398 can therefore act on the RL-95-2 cells because they do not possess the COX-1 that induced the mechanisms of compensation. For the Ishikawa cells, they possess COX-1, therefore the mechanisms of compensation, but the overexpression of EP3 inhibitor receptor could explain the diminution of proliferation in this cell line. Moreover, NS-398 also inhibits proliferation of TOV-1078D which expresses neither COX-1, nor COX-2 which could implicate a non specific action of NS-398. Some teams confirmed that NS-398 does not only act at the level of COX-2 (Hung,2000; Minter,2003). In the presence of NS-398, the pattern of cell proliferation provoked by different doses of resveratrol was not affected, indicating that a combination of COX-2 inhibitor does not increase the effect of resveratrol alone.

Resveratrol is known for its anti-proliferative effects on different cell lines and different tumors in animals (Carbo,1999; ElAttar,1999; Kampa,2000; Mgbonyebi,1998). This anti-proliferative effect induces apoptotic cell death in different cancers (Hsieh,1999; Kim,2004; Pozo-Guisado,2002). We have also proved that resveratrol induces, at high doses, a diminution of cell proliferation and a rise in the apoptotic cell death in all uterine cancer cells studied, except in the KLE line which stayed resistant to the resveratrol treatment. The KLE lines are known to be resistant to different chemotherapeutic agents (Gagnon,2004). This cell line would possess, then, a particular property that makes it resistant to different chemotherapeutic agents, such as resveratrol. The fact that the KLE cell line does not express any COX could explain in part the resistance to resveratrol, however, the cell line TOV-1078D, which also does not

express the COX, yet the resveratrol induced apoptosis in this cell line. This suggests that the resveratrol can act on targets other than the COX.

Knowing that resveratrol does not act uniquely at the COX level, we wanted to investigate where at the cellular level resveratrol could act. On breast cancer, resveratrol has the capacity to adjust the path of the PI 3-kinase via the ER- α permitting therefore a diminution of the cell growth (Pozo-Guisado,2004). With a treatment of LY294002, a PI 3-kinase inhibitor, we wanted to determine if resveratrol could signal through the Akt pathway. As we have already shown (St Germain,2004), the LY294002 has inhibited the growth of these cells, but resveratrol did not modify the effect of the LY294002, suggesting that the resveratrol does not act through this pathway in uterine cancers. In the literature, no study has been done to determine if resveratrol could signal through the PKA pathway. We have showed that the resveratrol, in human uterine cancer cell lines, does not interfere with the PKA pathway. In many types of cancers, resveratrol has the capacity to modulate the PKC pathway (Atten,2001; Slater,2003). However, as Stewart and al. has already shown (Stewart,2000), we have also showed that resveratrol had no effect on the PKC pathway in our system. Concerning the effect of the resveratrol on the MAP kinases signaling pathway, we have showed that the resveratrol had no effect on p38 Mapk and on MEK-1, in uterine cancers. On the other hand, on different systems other than the uterus, resveratrol inhibited the Map kinases (El Mowafy,1999; She,2001; Yu,2001). Therefore, resveratrol interferes with other cell signalling pathways other than those investigated in this study.

Concerning the effect of resveratrol on PGE₂ as such, tests of cell growth were carried out using different doses of resveratrol and PGE₂. In the Ishikawa cells, in the presence of PGE₂, cell growth was not induced. However, Ishikawa cells possess a high level of EP3 receptor. The inability of PGE₂ to induce cell growth in this line could be explained by the fact that there may be a problem at the transcription level of the mRNA into protein. To confirm this, Western blot type analyses with the antibodies specific to the EP3 receptor should be carried out. Another explanation could come from the fact

that the receptor could be present but not functional. In this case, tests on the receptor activity should also be carried out. The most plausible explanation rests therefore on the fact that the PGE₂ receptor EP3 is generally associated with the diminution of the intracellular cAMP, it is therefore a receptor inhibitor and would not allow cell growth (Narumiya, 1999). The balance between the presence of the EP3 receptor inhibitor and the weaker presence of the other three activator receptors could explain the fact that the cell growth of the Ishikawa stayed unchanged following treatment with different doses of PGE₂. PGE₂ production is undetectable in TOV-1078D and they do not produce mRNA for the four PGE₂ receptors, which explain the fact that different doses of the PGE₂ do not induce cell growth in this cell line.

Conclusion

Resveratrol induced a diminution of cell growth and an apoptotic cell death in all the cell lines possessing COX-1 and/or COX-2 (HeLa, HEC-1-A, RL-95-2 and Ishikawa), caused by the inhibition of the COX activity, and consequently by a diminution of PGE₂ production. On the other hand, resveratrol acted in a different way on the two cell lines not expressing COX-1 and COX-2 (KLE and TOV-1078D). The cell line KLE was resistant to resveratrol whereas it resveratrol induced apoptosis in TOV-1078D cells. Therefore in uterine cancers, resveratrol can have a target other than the COX activity and a signaling pathway other than PI 3-kinase/Akt, PKA, PKC, MEK-1 and p38 MAPK. Further studies should therefore investigate different potential targets of resveratrol in the human uterus.

Acknowledgements

We are grateful to Mrs Daphne Efford for reviewing the manuscript.

Figure legends

- Figure 2.1** Level of A) COX-1 mRNA, B) COX-2 mRNA, C) COX-1 protein and D) COX-2 protein in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells as determined by quantitative RT-PCR with LightCycler and Westerns analysis respectively. GAPDH was used as control to correct for loading. Data represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments. Columns with different superscript are significantly different ($p < 0.05$).
- Figure 2.2** Level of A) EP1 mRNA, B) EP2 mRNA, C) EP3 mRNA and D) EP4 mRNA in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells as determined by quantitative RT-PCR with LightCycler. GAPDH was used as control to correct for loading. Data represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments. Columns with different superscript are significantly different ($p < 0.05$).
- Figure 2.3** Effect of resveratrol (0, 3.125, 6.25, 12, 25, 50 and 100 μ M) on cellular proliferation in HeLa (■), HEC-1-A (▲), KLE (▼), RL-95-2 (◆), Ishikawa (●) and TOV-1078D (□) cells for a period of A) 24 hours, B) 48 hours and C) 72 hours, as determined by MTT proliferation assay. Data represent the mean \pm SEM of 6 independent experiments.
- Figure 2.4** Effect of resveratrol (0, 10 and 100 μ M) on PGE₂ production in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells for a period of 48 hours, as determined by the EIA assay. Data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$ compared to control. ** $p < 0.01$ compared to control. † $p < 0.001$ compared to control.

Figure 2.5 Effect of resveratrol (0, 10 and 100 μ M) in HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and TOV-1078D cells on apoptosis induction, after a period of 48 hours, as determined by A) Hoescht nuclear staining and B) DNA fragmentation. Data represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments. Columns with different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 2.6 Effect of resveratrol (0, 10 and 100 μ M) on A) HeLa, B) HEC-1-A, C) KLE, D) RL-95-2, E) Ishikawa and F) TOV-1078D cells for a period of 48 hours. Westerns analyses were performed on total protein content for Cleaved caspase-3 and CDC47. GAPDH was used as control to correct for loading. Data represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ compared to control. ** $p < 0.01$ compared to control. Columns with different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 2.7 Effect of resveratrol (0, 3.125, 6.25, 12, 25, 50 and 100 μ M), in the presence or absence of 5 μ M LY294002 and 5 μ M NS-398 on cellular proliferation in A) HeLa, B) HEC-1-A, C) KLE, D) RL-95-2, E) Ishikawa and F) TOV-1078D cells for a period of 48 hours, as determined by the MTT proliferation assay. Data represent the mean \pm SEM of 6 independent experiments.

Figure 2.8 Effect of resveratrol (0, 3.125, 6.25, 12, 25, 50 and 100 μ M), in the presence or absence of 5 μ M KT 5720, 5 μ M chelerythrine chloride (c.c.), 5 μ M PD98059 and 5 μ M SB 203580 on cellular proliferation in A) HeLa, B) HEC-1-A, C) KLE, D) RL-95-2, E) Ishikawa and F) TOV-1078D cells for a period of 48 hours, as determined by the MTT proliferation assay. Data represent the mean \pm SEM of 6 independent experiments.

Figure 2.9 Effect of PGE₂ (0, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ and 10⁻⁴ M), in the presence or absence of 10 and 100 µM resveratrol on cellular proliferation in A) Ishikawa and B) TOV-1078D cells, for a period of 48 hours, as determined by the MTT proliferation assay. Data represent the mean ± SEM of 6 independent experiments.

Figures

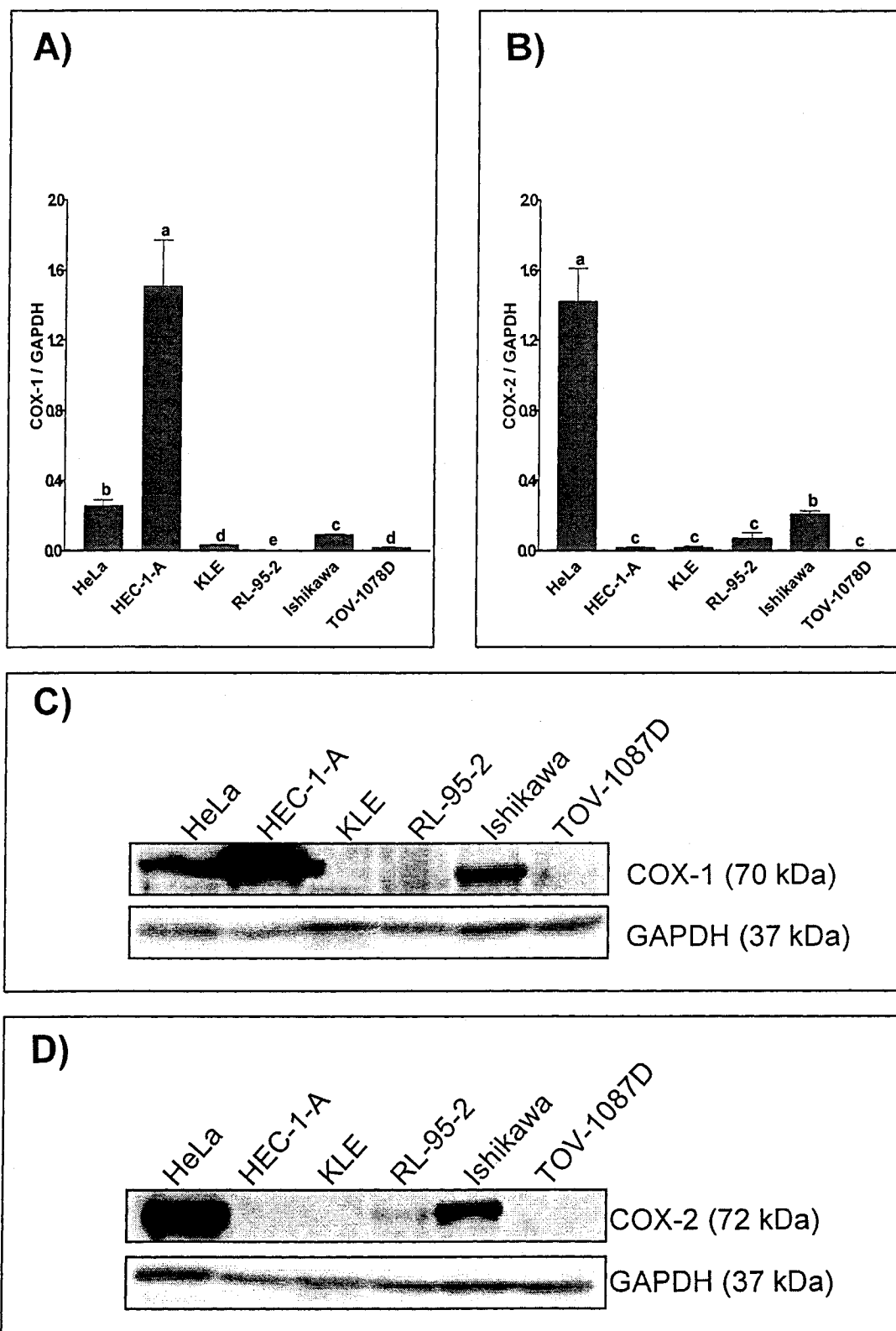


FIGURE 2.1

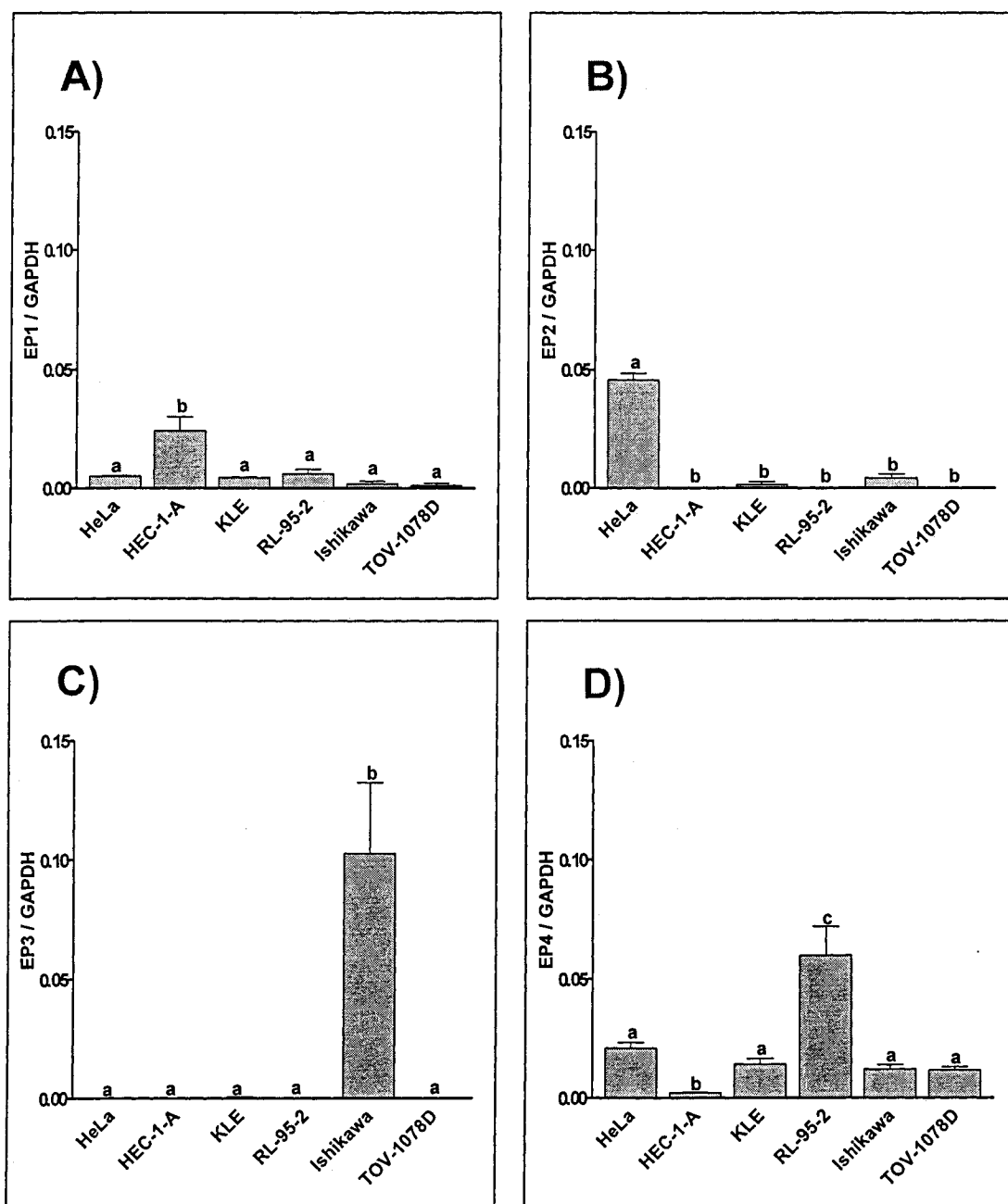


FIGURE 2.2

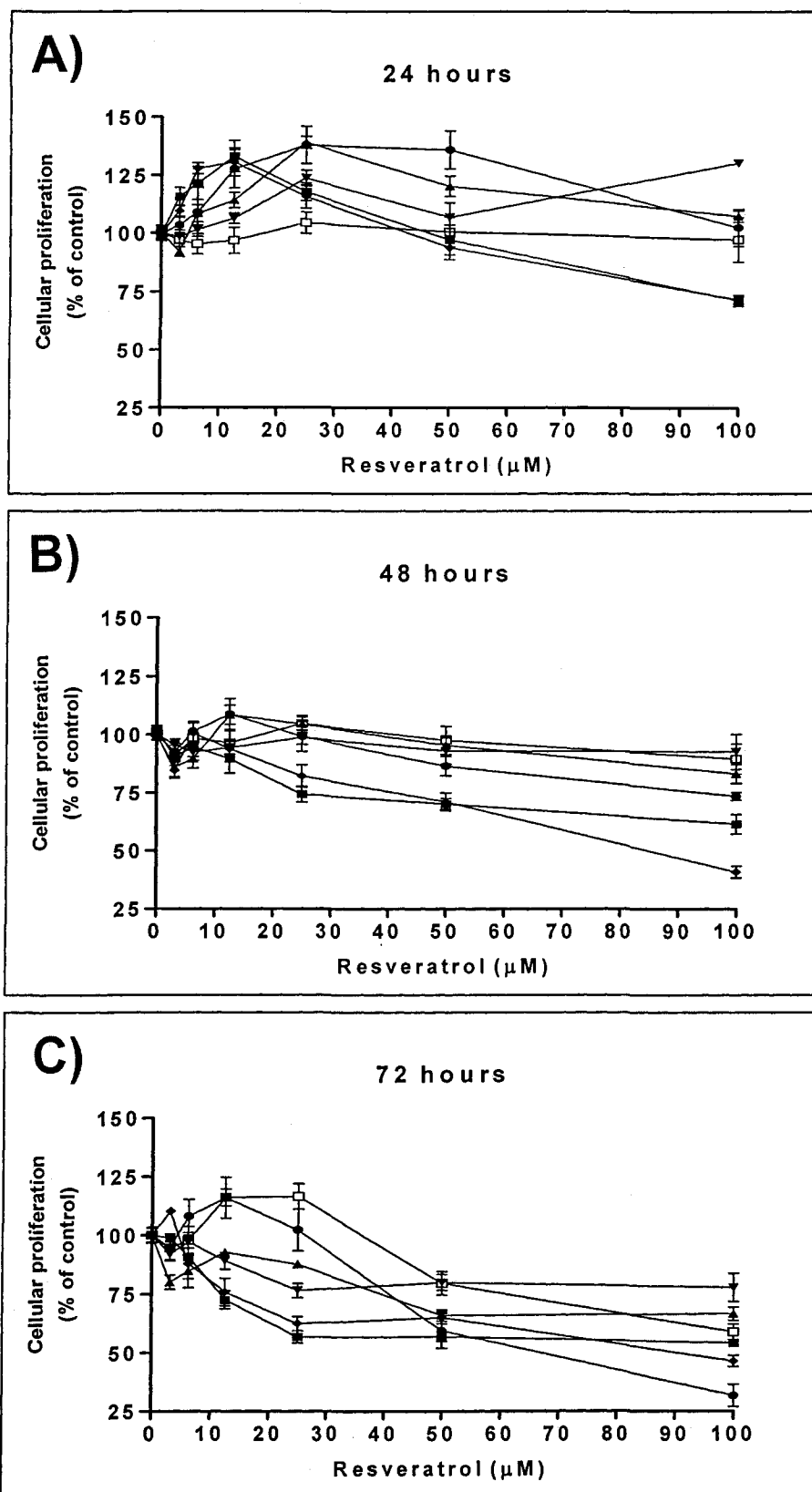


FIGURE 2.3

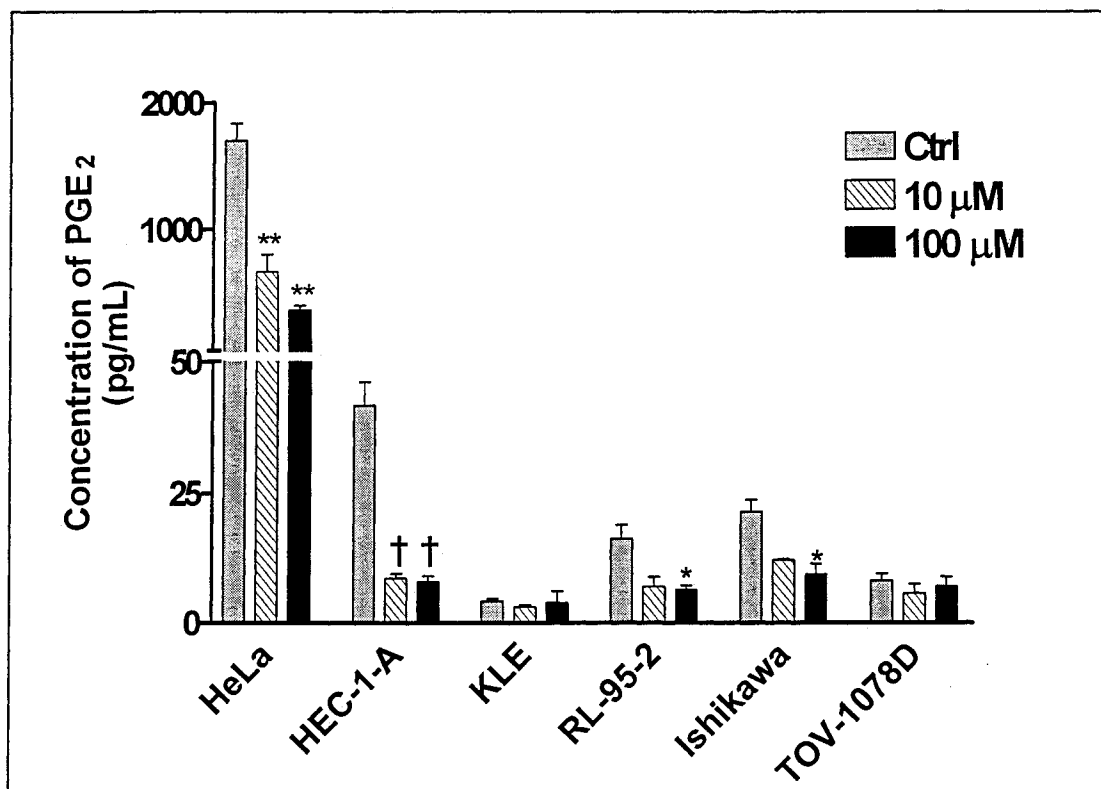


FIGURE 2.4

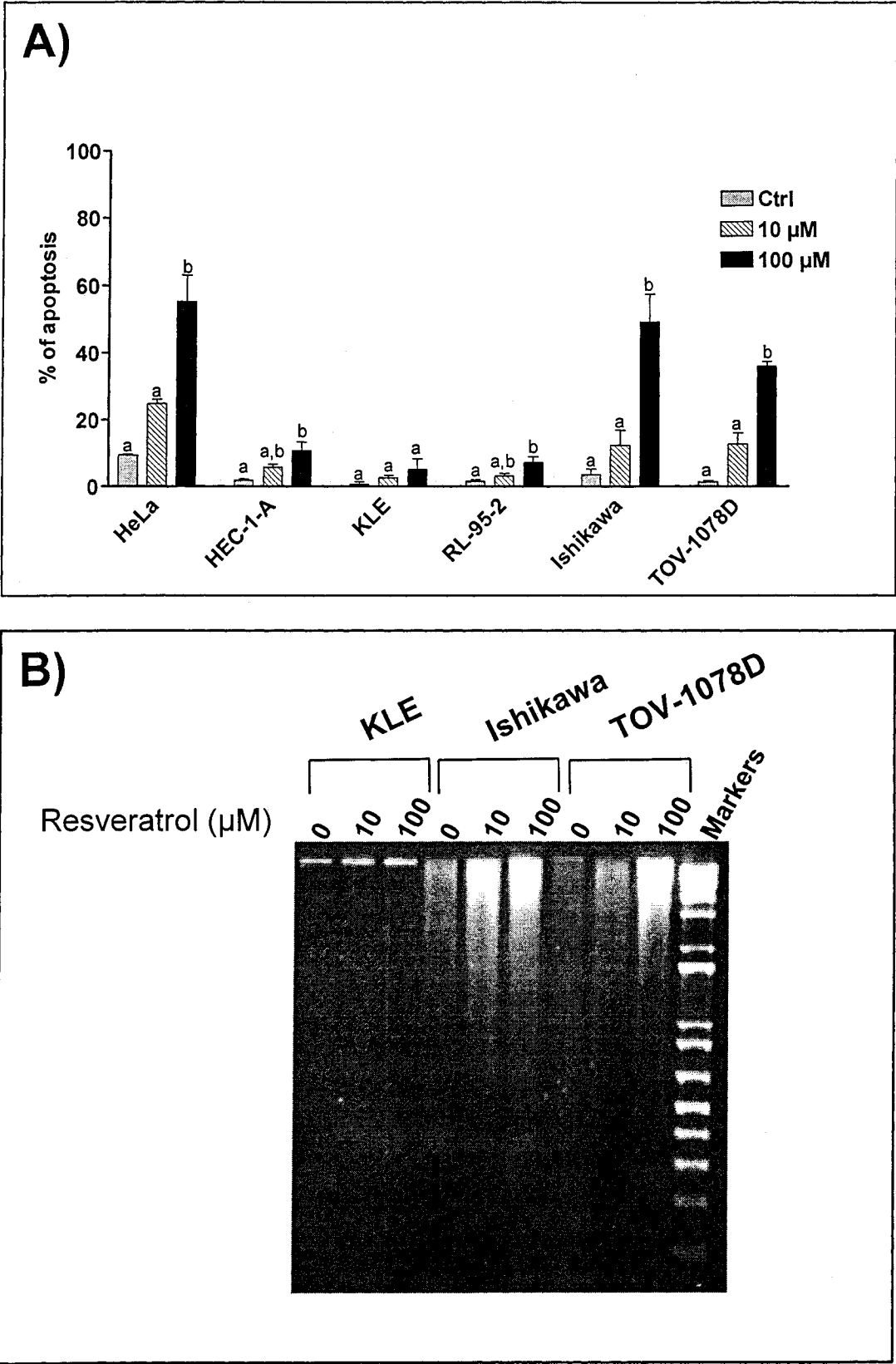


FIGURE 2.5

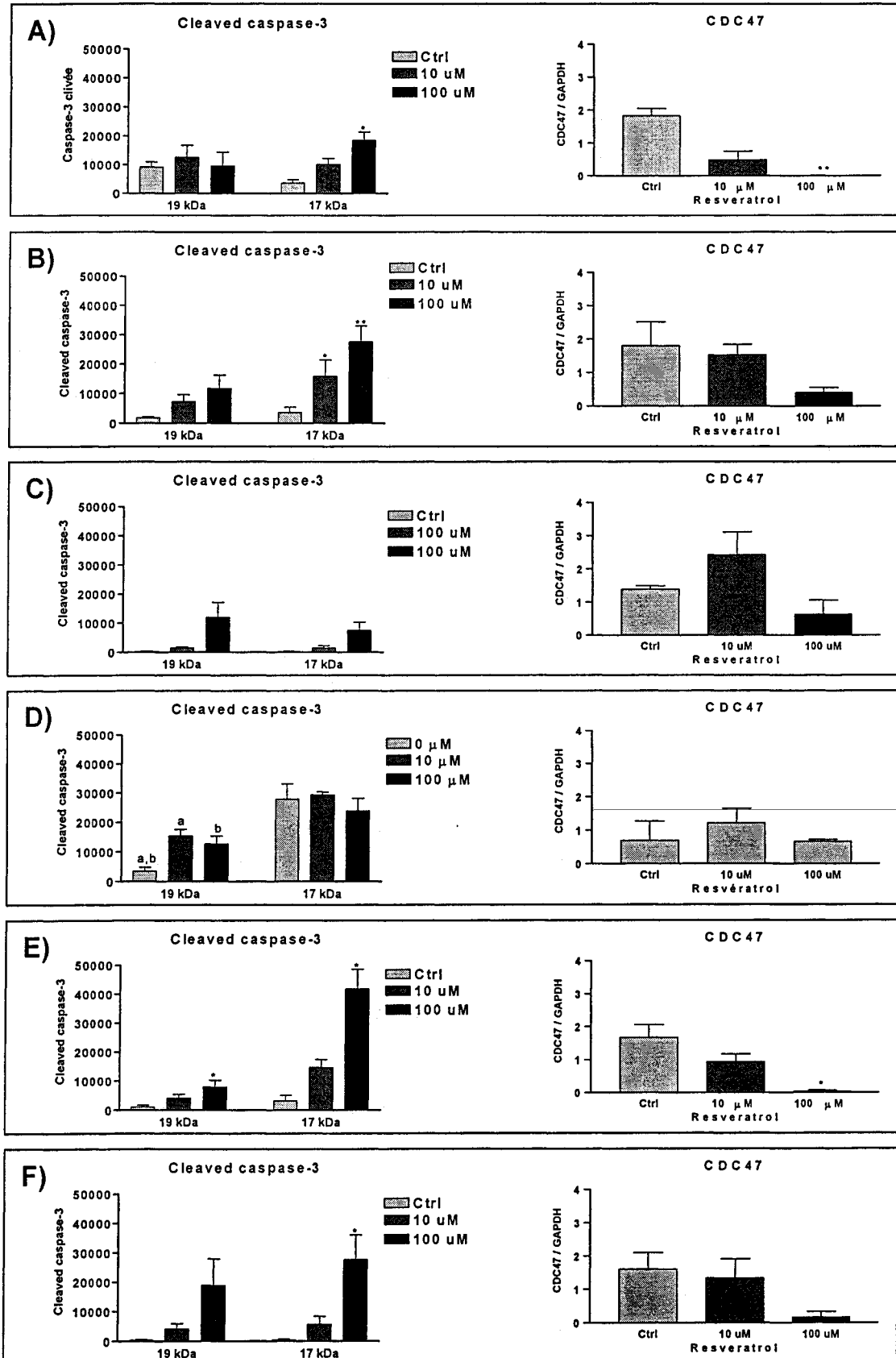


FIGURE 2.6

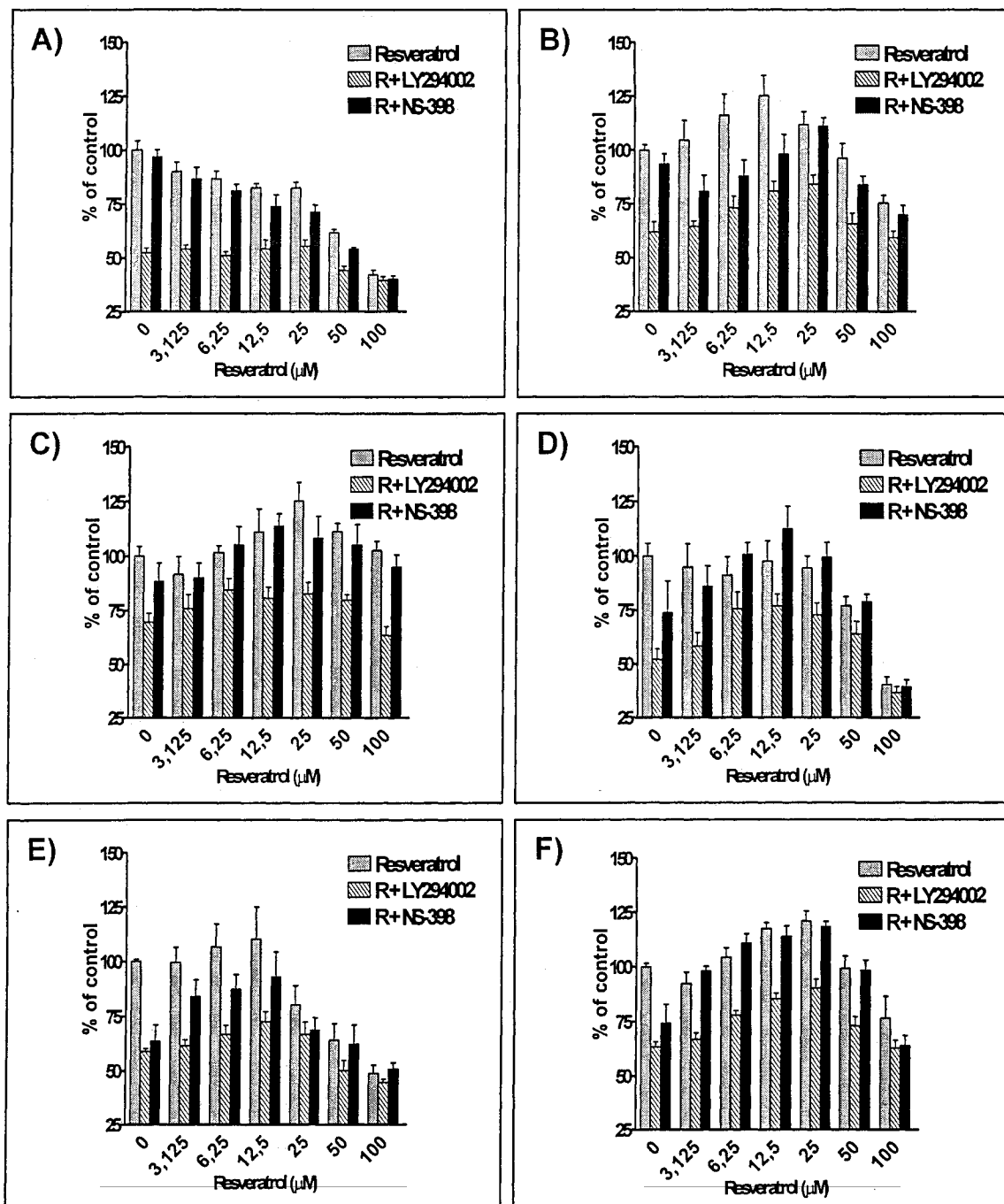


FIGURE 2.7

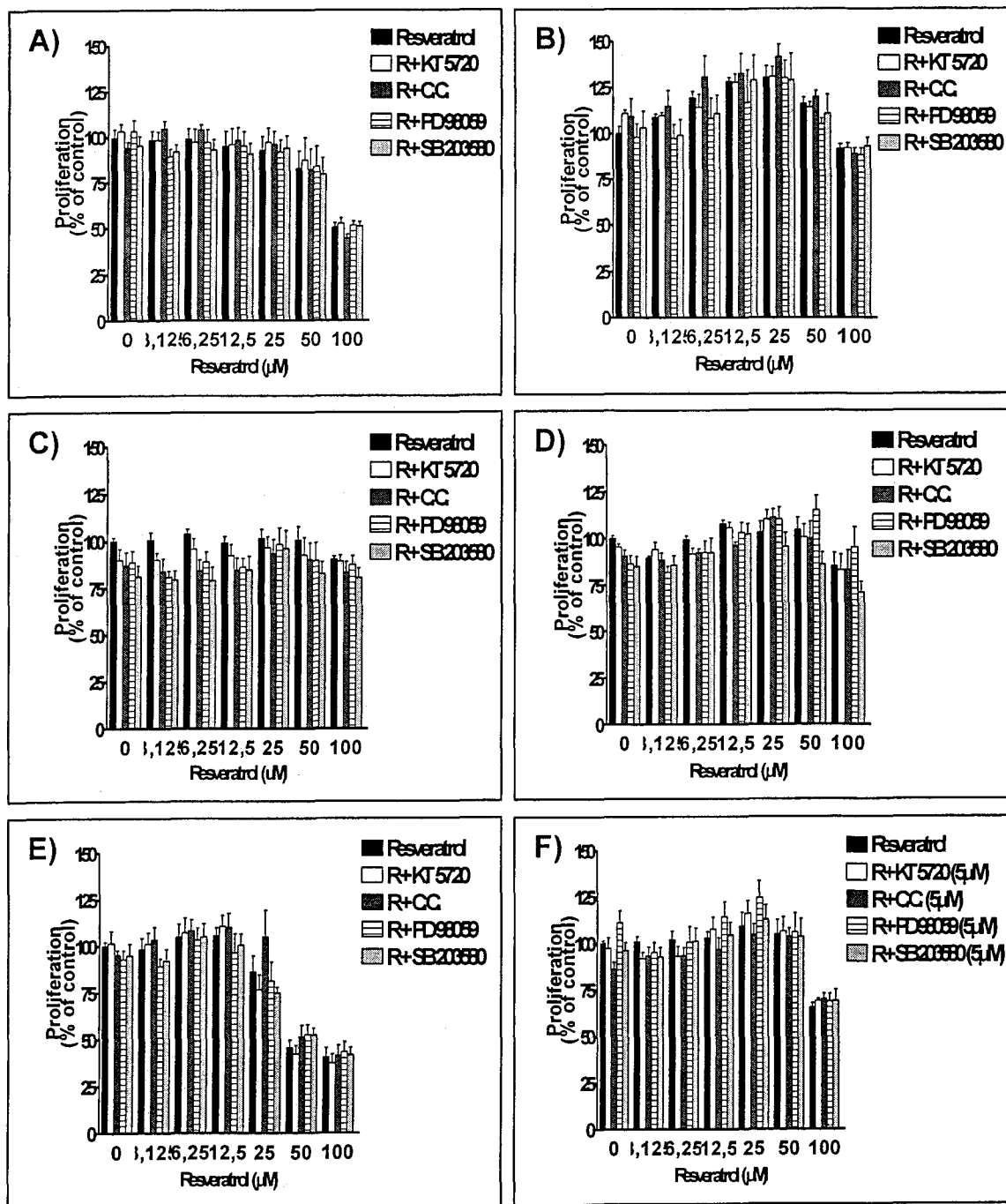


FIGURE 2.8

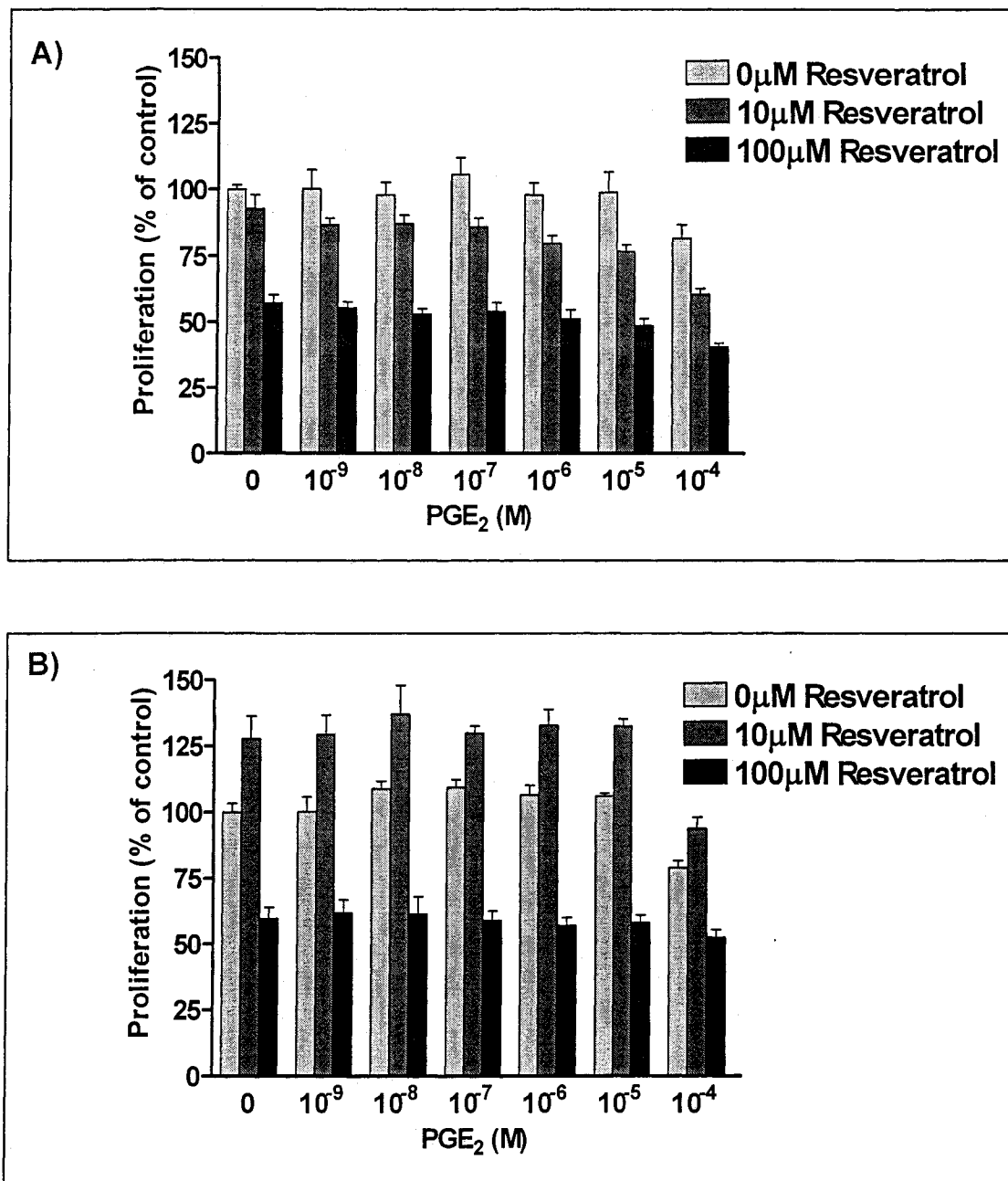


FIGURE 2.9

References

- Atten, M. J., Attar, B. M., Milson, T., Holian, O. (2001), "Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C-mediated mechanism", *Biochem.Pharmacol.* 62: 1423-1432.
- Bhat, K. P., Pezzuto, J. M. (2001), "Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells", *Cancer Res.* 61: 6137-6144.
- Carbo, N., Costelli, P., Baccino, F. M., Lopez-Soriano, F. J., Argiles, J. M. (1999), "Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model", *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 254: 739-743.
- Celotti, E., Ferrarini, R., Zironi, R., Conte, L. S. (1996), "Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone", *J.Chromatogr.A* 730: 47-52.
- Chulada, P. C., Thompson, M. B., Mahler, J. F., Doyle, C. M., Gaul, B. W., Lee, C., Tiano, H. F., Morham, S. G., Smithies, O., Langenbach, R. (2000), "Genetic disruption of Ptg-1, as well as Ptg-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice", *Cancer Res.* 60: 4705-4708.
- Coleman, R. A., Smith, W. L., Narumiya, S. (1994), "International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes", *Pharmacol.Rev.* 46: 205-229.
- De Ruvo, C., Amodio, R., Algeri, S., Martelli, N., Intilangelo, A., D'Ancona, G. M., Esposito, E. (2000), "Nutritional antioxidants as antidegenerative agents", *Int.J.Dev.Neurosci.* 18: 359-366.
- El Mowafy, A. M., White, R. E. (1999), "Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects", *FEBS Lett.* 451: 63-67.
- ElAttar, T. M., Virji, A. S. (1999), "Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation", *Anticancer Drugs* 10: 187-193.
- Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., Merillon, J. M. (1997), "Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests", *Life Sci.* 61: 2103-2110.
- Faustino, R. S., Sobrattee, S., Edel, A. L., Pierce, G. N. (2003), "Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines", *Mol.Cell Biochem.* 249: 11-19.

- Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K., Asselin, E. (2004), "AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells", *Gynecol.Oncol.* 94: 785-795.
- Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D. G., Mukhtar, H. (2000), "Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma", *Prostate* 42: 73-78.
- Hofmann, G. E., Rao, C. V., De Leon, F. D., Toledo, A. A., Sanfilippo, J. S. (1985), "Human endometrial prostaglandin E2 binding sites and their profiles during the menstrual cycle and in pathologic states", *Am.J.Obstet.Gynecol.* 151: 369-375.
- Howe, L. R., Subbaramaiah, K., Brown, A. M., Dannenberg, A. J. (2001), "Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer", *Endocr.Relat Cancer* 8: 97-114.
- Hsieh, T. C., Wu, J. M. (1999), "Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines", *Exp.Cell Res.* 249: 109-115.
- Hung, W. C., Chang, H. C., Pan, M. R., Lee, T. H., Chuang, L. Y. (2000), "Induction of p27(KIP1) as a mechanism underlying NS398-induced growth inhibition in human lung cancer cells", *Mol.Pharmacol.* 58: 1398-1403.
- Hwang, D., Scollard, D., Byrne, J., Levine, E. (1998), "Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer", *J.Natl.Cancer Inst.* 90: 455-460.
- Ishihara, O., Tsutsumi, O., Mizuno, M., Kinoshita, K., Satoh, K. (1986), "Metabolism of arachidonic acid and synthesis of prostanoids in human endometrium and decidua", *Prostaglandins Leukot.Med.* 24: 93-102.
- Jabbour, H. N., Boddy, S. C. (2003), "Prostaglandin E2 induces proliferation of glandular epithelial cells of the human endometrium via extracellular regulated kinase 1/2-mediated pathway", *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88: 4481-4487.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. (1997), "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes", *Science* 275: 218-220.
- Kampa, M., Hatzoglou, A., Notas, G., Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P. M., Castanas, E. (2000), "Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines", *Nutr.Cancer* 37: 223-233.
- Kim, Y. A., Choi, B. T., Lee, Y. T., Park, D. I., Rhee, S. H., Park, K. Y., Choi, Y. H. (2004), "Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells", *Oncol.Rep.* 11: 441-446.

- Kirschenbaum, A., Klausner, A. P., Lee, R., Unger, P., Yao, S., Liu, X. H., Levine, A. C. (2000), "Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate", *Urology* 56: 671-676.
- Kulkarni, S., Rader, J. S., Zhang, F., Liapis, H., Koki, A. T., Masferrer, J. L., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J. (2001), "Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer", *Clin.Cancer Res.* 7: 429-434.
- Kundu, J. K., Chun, K. S., Kim, S. O., Surh, Y. J. (2004), "Resveratrol inhibits phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse skin: MAPKs and AP-1 as potential molecular targets", *Biofactors* 21: 33-39.
- Langcake, P., Pryce, R. J. (1977), "A new class of phytoalexins from grapevines", *Experientia* 33: 151-152.
- MacDonald, P. C., Porter, J. C., Schwarz, B. E., Johnston, J. M. (1978), "Initiation of parturition in the human female", *Semin.Perinatol.* 2: 273-286.
- Martinez, J., Moreno, J. J. (2000), "Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production", *Biochem.Pharmacol.* 59: 865-870.
- Mgbonyebi, O. P., Russo, J., Russo, I. H. (1998), "Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells", *Int.J.Oncol.* 12: 865-869.
- Minter, H. A., Eveson, J. W., Huntley, S., Elder, D. J., Hague, A. (2003), "The cyclooxygenase 2-selective inhibitor NS398 inhibits proliferation of oral carcinoma cell lines by mechanisms dependent and independent of reduced prostaglandin E2 synthesis", *Clin.Cancer Res.* 9: 1885-1897.
- Murias, M., Handler, N., Erker, T., Pleban, K., Ecker, G., Saiko, P., Szekeres, T., Jager, W. (2004), "Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship", *Bioorg.Med.Chem.* 12: 5571-5578.
- Mutoh, M., Takahashi, M., Fukuda, K., Matsushima-Hibiya, Y., Mutoh, H., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2000), "Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure", *Carcinogenesis* 21: 959-963.
- Narko, K., Ristimaki, A., MacPhee, M., Smith, E., Haudenschield, C. C., Hla, T. (1997), "Tumorigenic transformation of immortalized ECV endothelial cells by cyclooxygenase-1 overexpression", *J.Biol.Chem.* 272: 21455-21460.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. (1999), "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions", *Physiol Rev.* 79: 1193-1226.

Orsini, F., Pelizzoni, F., Verotta, L., Aburjai, T., Rogers, C. B. (1997), "Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-O-beta-D-glucopyranoside and related compounds", *J.Nat.Prod.* 60: 1082-1087.

Pace-Asciak, C. R., Hahn, S., Diamandis, E. P., Soleas, G., Goldberg, D. M. (1995), "The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease", *Clin.Chim.Acta* 235: 207-219.

Pendurthi, U. R., Williams, J. T., Rao, L. V. (1999), "Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells : A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19: 419-426.

Pickles, V. R., Hall, W. J., Best, F. A., Smith, G. N. (1965), "Prostaglandins in endometrium and menstrual fluid from normal and dysmenorrhoeic subjects", *J.Obstet.Gynaecol.Br.Commonw.* 72: 185-192.

Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Mulero-Navarro, S., Santiago-Josefat, B., Fernandez-Salguero, P. M. (2002), "The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle", *Biochem.Pharmacol.* 64: 1375-1386.

Pozo-Guisado, E., Lorenzo-Benayas, M. J., Fernandez-Salguero, P. M. (2004), "Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation", *Int.J.Cancer* 109: 167-173.

Prodi, G., De Giovanni, C., Galli, M. C., Gola, G., Grilli, S., Rocchetta, R., Orlandi, C. (1979), "17 beta-estradiol, 5 alpha-dihydrotestosterone, progesterone and cortisol receptors in normal and neoplastic human endometrium", *Tumori* 65: 241-253.

Ristimaki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H., Isola, J. (2002), "Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer", *Cancer Res.* 62: 632-635.

Rotondo, S., Rajtar, G., Manarini, S., Celardo, A., Rotillo, D., de Gaetano, G., Evangelista, V., Cerletti, C. (1998), "Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function", *Br.J.Pharmacol.* 123: 1691-1699.

Sales, K. J., Jabbour, H. N. (2003), "Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium", *Reproduction.* 126: 559-567.

Sales, K. J., Katz, A. A., Howard, B., Soeters, R. P., Millar, R. P., Jabbour, H. N. (2002), "Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1", *Cancer Res.* 62: 424-432.

Schneider, Y., Vincent, F., Duranton, B., Badolo, L., Gosse, F., Bergmann, C., Seiler, N., Raul, F. (2000), "Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells", *Cancer Lett.* 158: 85-91.

She, Q. B., Bode, A. M., Ma, W. Y., Chen, N. Y., Dong, Z. (2001), "Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase", *Cancer Res.* 61: 1604-1610.

Singh, E. J., Baccarini, I., Zuspan, F. P. (1975), "Levels of prostaglandins F-2alpha and E-2 in human endometrium during the menstrual cycle", *Am.J.Obstet.Gynecol.* 121: 1003-1006.

Slater, S. J., Seiz, J. L., Cook, A. C., Stagliano, B. A., Buzas, C. J. (2003), "Inhibition of protein kinase C by resveratrol", *Biochim.Biophys.Acta* 1637: 59-69.

St Germain, M. E., Gagnon, V., Parent, S., Asselin, E. (2004), "Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway", *Mol.Cancer* 3: 7.

Stewart, J. R., Christman, K. L., O'Brian, C. A. (2000), "Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation", *Biochem.Pharmacol.* 60: 1355-1359.

Subbaramaiah, K., Chung, W. J., Michaluart, P., Telang, N., Tanabe, T., Inoue, H., Jang, M., Pezzuto, J. M., Dannenberg, A. J. (1998), "Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells", *J.Biol.Chem.* 273: 21875-21882.

Subbaramaiah, K., Michaluart, P., Chung, W. J., Tanabe, T., Telang, N., Dannenberg, A. J. (1999), "Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells", *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 889: 214-223.

Szewczuk, L. M., Forti, L., Stivala, L. A., Penning, T. M. (2004a), "Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents", *J.Biol.Chem.* 279: 22727-22737.

Szewczuk, L. M., Lee, S. H., Blair, I. A., Penning, T. M. (2005), "Viniferin formation by COX-1: evidence for radical intermediates during co-oxidation of resveratrol", *J.Nat.Prod.* 68: 36-42.

Szewczuk, L. M., Penning, T. M. (2004b), "Mechanism-based inactivation of COX-1 by red wine m-hydroquinones: a structure-activity relationship study", *J.Nat.Prod.* 67: 1777-1782.

Trifan, O. C., Hla, T. (2003), "Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis", *J.Cell Mol.Med.* 7: 207-222.

Yu, R., Hebbar, V., Kim, D. W., Mandlekar, S., Pezzuto, J. M., Kong, A. N. (2001), "Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways", *Mol.Pharmacol.* 60: 217-224.

CHAPITRE III

CONCLUSION GÉNÉRALE

Discussion et conclusion

Le resvératrol est une molécule naturelle qui est de plus en plus étudiée. Il est déjà connu pour ses effets bénéfiques au niveau du système cardiovasculaire (Pace-Asciak,1995; Pendurthi,1999), ses effets antioxydants aux niveaux des maladies neurodégénératives telles l'Alzheimer et le Parkinson (De Ruvo,2000; Dore,2005) et pour ses effets anti-cancers aux niveaux de différents organes du corps humain, dont entre autre la prostate (Hsieh,1999), le sein (Mgbonyebi,1998) et le colon (Schneider,2000). Par contre, ses effets aux niveaux des cancers utérins sont très peu connus. Jusqu'à ce jour, seulement deux études ont été effectuées avec le resvératrol au niveau du cancer endométrial humain. En 2001, l'équipe de Bath et Pezzuto (2001b) démontra pour la première fois que le resvératrol agit en temps qu'anti-œstrogène par la régulation négative du récepteur alpha à l'œstrogène (ER- α). Ce récepteur étant présent en plus faible quantité, il y aura donc inhibition de la prolifération des cellules endométriales normalement induite par l'œstrogène. Une autre équipe de chercheurs démontra également que le resvératrol a la capacité d'inhiber la croissance cellulaire des cellules cancéreuses endométriales, mais proposa un mécanisme via la régulation négative du gène du facteur de croissance épithélial, EGF (Kaneuchi,2003), le produit de ce gène étant en partie responsable de la prolifération des cellules épithéliales de l'endomètre (Smith,1989). Bien que ces deux études démontrent l'effet antiprolifératif du resvératrol, aucune n'étudie le potentiel effet apoptotique du resvératrol; la mort cellulaire étant l'objectif ultime à atteindre afin de vaincre le cancer. Ces deux études ont été effectuées avec la lignée cancéreuse endométriale humaine Ishikawa seulement. Étant donné que les patientes peuvent réagir de manière très différente à un même traitement, l'objectif était d'étudier les effets du resvératrol sur cinq lignées cancéreuses de l'endomètre humain (HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa et TOV-1078D), ces cancers étant majoritairement de type adénocarcinome et de type carcinome indifférencié de l'endomètre. Nous avons également utilisé une lignée cancéreuse du col de l'utérus, la lignée HeLa, puisque c'est une lignée de type adénocarcinome, comme le sont la majorité des cancers de l'endomètre et que c'est une lignée très bien caractérisée, qui produit les deux isoformes de la COX et qui réagit généralement bien aux agents chimiothérapeutiques. Cette lignée sert donc de contrôle positif.

L'hormone PGE₂ et par conséquent les enzymes COXs sont présents en grande quantité dans l'utérus humain (Pickles,1965). La PGE₂ a des actions très importantes telles que son implication dans le processus de décidualisation dans l'endomètre permettant l'implantation de l'embryon (Ishihara,1986), son implication dans l'initiation de l'accouchement chez la femme (MacDonald,1978) et son implication durant le cycle menstruel (Singh,1975). Une des actions la plus étudiée du resvératrol est sa capacité à inhiber les COXs. Certains ont démontré l'action spécifique du resvératrol sur la transcription et l'activité de la COX-2 (Subbaramaiah,1998), alors que d'autres concluent à une action sur l'activité enzymatique de la COX-1 seulement (Szewczuk,2004). Puisque les COXs sont exprimés et produits dans l'utérus, ce dernier est donc une cible potentielle du resvératrol. Étant donné la présence importante du récepteur ER- α au niveau de l'endomètre normal et néoplasique (Prodi,1979) et la capacité du resvératrol à s'y lier (Bhat,2001b), l'utérus est, une fois de plus, une cible potentielle pour cette molécule.

Dans un premier temps, nous avons procédé à la caractérisation de la présence en ARNm et en protéines des COXs et la présence en ARNm des récepteurs à la PGE₂. Les cellules HeLa, HEC-1-A, RL-95-2 et Ishikawa sont celles qui expriment et produisent COX-1 et/ou COX-2 et ce sont également celles qui produisent la PGE₂, comme déterminé à l'aide d'un dosage immunoenzymatique pour la PGE₂. Nous avons démontré que toutes les lignées cellulaires nommées précédemment qui expriment et produisent la COX-1 et/ou la COX-2 sont celles qui expriment principalement l'ARNm des sous-types des récepteurs à la PGE₂. Par contre, le niveau d'expression en ARNm des récepteurs à la PGE₂ fut différent pour chaque lignée, EP1 étant principalement exprimé chez les HeLa, EP2 principalement chez les HEC-1-A et EP4 principalement chez les RL-95-2. Pour ce qui est du récepteur inhibiteur, EP3, c'est chez la lignée Ishikawa que l'on retrouve la plus forte expression en ARNm de ce récepteur. Puisqu'il y a présence de l'ARNm de l'un ou l'autre des récepteurs à la PGE₂, cela indique donc que la PGE₂ produite peut possiblement agir chez ces quatre lignées cellulaires. Par contre, étant donné que nous n'avons pas vérifié s'il y avait production des récepteurs,

nous ne pouvons pas affirmer hors de tout doute que la PGE₂ produite aura un effet. De plus, même si le récepteur est produit, il doit être fonctionnel. Des tests d'activités des récepteurs devront donc être également effectués. Pour ce qui est des cellules KLE et TOV-1078D, elles n'expriment et ne produisent ni l'une ni l'autre des COXs, et elles expriment des taux quasi indétectables des ARNm des différents récepteurs à la PGE₂. Pour ces deux lignées, les COXs et la PGE₂ ne sont donc pas des éléments déterminants dans la prolifération cellulaire. En gardant à l'esprit l'inhibition possible des COXs par le resvératrol, cela laisse supposer que le resvératrol n'aura pas d'action sur ces lignées. Ce point sera abordé plus tard au cours de la discussion. Finalement, contrairement à l'équipe de Tong *et al* (2000) qui prétend que l'expression de COX-1 n'est pas altérée dans les carcinomes endométriaux, nous avons dénoté une surexpression de l'ARNm et de la protéine COX-1 notamment au niveau des cellules HEC-1-A. Ceci permet donc de supposer que COX-1, tout comme la COX-2, peut intervenir dans les processus de cancérisation dans des cas de cancers endométriaux humains, tout comme c'est le cas pour d'autres types de cancers dont notamment le cancer du col utérin chez la femme (Sales,2002).

Suite à des traitements au resvératrol, nous avons démontré que chez les cellules possédant COX-1 et/ou COX-2 (HeLa, HEC-1-A, RL-95-2 et TOV-1078D), le resvératrol induit une diminution de la production de PGE₂. Bien que le resvératrol n'agisse pas au niveau du taux d'expression des protéines COX-1 et COX-2 au niveau des cancers utérins étudiés (résultats observés au laboratoire, mais non présentés dans l'article du chapitre II) comme pouvait le suggérer des études effectuées aux niveaux de différents systèmes (Kundu,2004; Martinez,2000; Mutoh,2000; Subbaramaiah,1998; Subbaramaiah,1999), cette diminution de la production en PGE₂ suggère un effet sur l'activité des COXs. Comme l'a démontré l'équipe de Szewczuk *et al.* (2004), le resvératrol agit au niveau de l'activité enzymatique de la COX-1, ce qui concorde avec nos résultats puisque le resvératrol induit une diminution de la production de PGE₂ chez toutes les lignées exprimant et produisant la COX-1, soit les lignées HeLa, HEC-1-A et Ishikawa. Par contre, chez la lignée cancéreuse RL-95-2, qui exprime la COX-2 et qui n'exprime pas de façon détectable la COX-1, le resvératrol induit tout de même une

diminution de production en PGE_2 . Ceci laisse croire que le resvératrol peut avoir une action sur une autre cible que la COX-1, probablement sur la COX-2. Une des études proposant l'effet du resvératrol au niveau de la production protéique de la COX-2 proposait également une action de cette molécule au niveau de l'activité enzymatique de la COX-2 au niveau du cancer du sein (Subbaramaiah, 1998), ce qui correspond avec nos résultats puisque toutes les lignées exprimant la COX-2 (HeLa, RL-95-2 et Ishikawa) ont vu leur niveau de PGE_2 diminué suite à un traitement au resvératrol. Dans ce présent cas, ce sont les cellules HEC-1-A qui ne produisent pas de façon détectable la COX-2 et chez qui le traitement au resvératrol induit une diminution de la quantité de PGE_2 . Les lignées KLE et TOV-1078D, n'exprimant pas des niveaux détectables de ni l'une ni l'autre des COXs, produisent tout de même un taux basal de PGE_2 . Ceci s'explique par le fait que le produit utilisé pour la détection des protéines par immunobuvardage, le "SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate", peut détecter une quantité minimale de protéine de 10^{-15}g (Mattson, 1996). Toute quantité inférieure ne peut être détectée. Ces deux lignées cellulaires ont vu leur taux de PGE_2 inchangé suite à un traitement au resvératrol, suggérant que le niveau des COXs n'était pas assez élevé pour détecter une activité du resvératrol. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le resvératrol aurait une action sur l'activité de la COX-1 et de la COX-2. Pour confirmer cette hypothèse, des essais d'activité enzymatique sur la COX-1 et la COX-2 devront être effectués en présence de différentes doses en resvératrol et ce, pour les six lignées cellulaires à l'étude.

Le resvératrol est connu pour ses effets antiprolifératifs sur différentes lignées cellulaires et différentes tumeurs dans un modèle animal (Carbo, 1999; ElAttar, 1999; Kampa, 2000; Mgbonyebi, 1998). Cet effet antiprolifératif mène à l'induction de la mort cellulaire apoptotique dans plusieurs cancers (Hsieh, 1999; Kim, 2004; Pozo-Guisado, 2002). Nous avons également démontré que le resvératrol induit, à fortes doses, une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire apoptotique chez toutes les lignées cancéreuses utérines étudiées, sauf chez la lignée KLE qui elle demeure résistante au traitement au resvératrol. Les cellules KLE sont déjà connues pour être résistantes au cisplatine (Gagnon, 2004a). Cette lignée

posséderait donc une particularité la rendant insensible aux agents chimiothérapeutiques dont le resvératrol. Le fait que la lignée KLE n'exprime pas de façon détectable les COXs pourrait en partie expliquer la résistance au resvératrol. Par contre, chez les cellules TOV-1078D, tout comme chez les cellules KLE, la production des COXs ne fut pas détectée et le resvératrol a tout de même induit une diminution de prolifération cellulaire et une augmentation de la mort apoptotique chez cette lignée. Ceci laisse donc croire que le resvératrol n'aurait pas une action unique au niveau de l'activité enzymatique des COXs. Le resvératrol pourrait possiblement agir sur une ou plusieurs autres cibles cellulaires impliquées dans le cancer endométrial humain.

Étant donné l'action possible du resvératrol sur une ou plusieurs autres cibles que les COXs, nous avons donc voulu déterminer le rôle du resvératrol au niveau de différentes voies de signalisation cellulaire. Tout d'abord, nous avons étudié l'effet du resvératrol au niveau de la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-k). Il a été prouvé qu'une défaillance au niveau de la régulation de cette voie de survie cellulaire était souvent impliquée dans des cas de cancers utérins (Kanamori,2001; Uegaki,2005). Au niveau du cancer du sein, le resvératrol a la capacité de moduler la voie de la PI 3-k via le récepteur ER- α à l'œstrogène permettant ainsi une diminution de la prolifération cellulaire (Pozo-Guisado,2004). Avec un traitement au LY294002, un inhibiteur de la protéine PI 3-k, nous avons voulu déterminer si le resvératrol avait également la capacité de moduler cette voie de signalisation cellulaire au niveau de l'utérus. Aucune autre étude n'a été menée afin de trouver l'effet possible du resvératrol au niveau de la voie de la PI 3-k dans des cas de cancers utérins. Comme nous l'avions déjà démontré (St Germain,2004), le LY294002 a effectivement permis d'inhiber la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses utérines, mais le resvératrol n'a pas permis de modifier l'action du LY294002, ce qui veut dire que le resvératrol utilise une autre voie que la PI 3-k pour son action au niveau des cancers utérins. La protéine kinase A (PKA) est présente dans une voie de signalisation cellulaire dont la suractivation peut être impliquée dans différents cancers gynécologiques (Dabizzi,2003; McDaid,1999). En ce qui concerne cette protéine, on ne retrouve aucune étude dans la littérature scientifique qui ait été effectuée avec le resvératrol. Nous avons démontré que le resvératrol, au niveau du

cancer de l'endomètre, n'interfère pas avec l'action de la protéine PKA, puisque nous avons observé le même patron de prolifération cellulaire lors des tests de prolifération cellulaire avec le resvératrol seul ou en combinaison avec un inhibiteur de PKA, le KT 5720. Dans plusieurs types de cancers, la protéine kinase C (PKC) est impliquée dans les processus de cancérisation (Connor,1997; Pan,2005). Des études ont suggéré que le resvératrol a la capacité d'inhiber la PKC (Atten,2001; Slater,2003). Par contre, tout comme Stewart *et al.* (2000), nous avons démontré que le resvératrol n'agissait pas au niveau de la PKC. Finalement, nous avons étudié la possibilité que l'action du resvératrol se fasse via les voies de signalisation cellulaire des protéines MAP-kinases ("mitogen activated proteins-kinases"), ces dernières étant notamment impliquées dans le cancer de l'endomètre (Taniguchi,2003). Le resvératrol peut induire une diminution de la phosphorylation des protéines ERK-1/-2, JNK-1 et p38, toutes impliquées dans la voie de survie cellulaire des MAP-kinases, dans les muscles lisses des artères coronaires (El Mowafy,1999). Pour ce qui est du cancer de l'endomètre, nous avons démontré pour la toute première fois que le resvératrol n'agit pas au niveau de p38 MAPK et de MEK-1, deux protéines impliquées dans la voie des MAP-kinases. Dans les cas de cancers endométriaux, le resvératrol interfère donc avec d'autres voies de signalisation cellulaire que celles étudiées dans la présente étude. Une voie de signalisation cellulaire qui n'a pas été examinée est la voie de NF- κ B. La protéine NF- κ B induit l'expression du gène de la COX-2 (St Germain,2004), mais aussi l'expression de différents autres gènes permettant la prolifération cellulaire, l'angiogénèse, la motilité, la migration et l'inflammation des cellules (Nakanishi,2005). NF- κ B est présent dans le cytoplasme, mais il est séquestré par une protéine nommée I κ B. L'activation de la protéine Akt, donc sa phosphorylation, entraîne une activation de I κ B-kinase. La protéine I κ B-kinase permet la phosphorylation et la dégradation de I κ B, donc la libération du facteur de transcription nucléaire NF- κ B. On sait maintenant que le resvératrol inhibe l'activité de I κ B-kinase (Estrov,2003; Holmes-McNary,2000), favorisant ainsi la séquestration de la protéine NF- κ B, l'empêchant donc d'effectuer toutes ses actions pro-cancers. Ainsi, des essais de prolifération cellulaire au MTT avec un inhibiteur de I κ B-kinase en présence de resvératrol pourraient être effectués afin de déterminer si le resvératrol utilise cette voie de signalisation au niveau du cancer de l'endomètre humain. Advenant un résultat

positif, des analyses de type Western Blot devront être effectuées à l'aide d'un anticorps contre I κ B-kinase et avec des anticorps contre les autres protéines de cette voie de signalisation cellulaire et ce, chez les six lignées cancéreuses utérines traitées avec différentes doses en resvératrol. Ainsi, il serait possible de cibler plus précisément au niveau de quelle (s) protéine (s) est l'action du resvératrol.

Il y a plusieurs voies de signalisation cellulaire à l'intérieur d'une cellule, donc plusieurs cibles potentielles. Il est difficile d'étudier, chez chacune des cibles, l'effet du resvératrol. Par contre, il existe maintenant une technologie qui permet de le faire : les puces à ADN ou "microarrays". Les puces d'ADN sont de petites plaques avec des milliers de petites puces contenant chacune des oligonucléotides correspondant à des gènes. Les ARNs extraits des échantillons à tester sont marqués (ex. : avec un chromophore) lors de la rétrotranscription en ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc peut alors se fixer à son oligonucléotide complémentaire sur la puce d'ADN. Après acquisition des images d'hybridation, la quantification des signaux d'hybridation reflète le niveau d'expression, dans l'échantillon initial, de chacun des gènes représentés sur la puce. Il sera donc possible de visualiser la différence d'expression des gènes suite à un traitement au resvératrol des lignées cellulaires à l'étude. Ainsi, il sera plus facile de cibler les gènes régulés par un traitement au resvératrol. Par contre, cette méthode ne peut pas nous dévoiler l'action du resvératrol en ce qui concerne la traduction en protéine ou encore si le resvératrol a une action sur l'activité enzymatique des protéines. Cette méthode sert surtout à nous orienter vers une voie de signalisation cellulaire ciblée par le resvératrol.

Dans le but de vérifier si la combinaison avec un autre inhibiteur de COXs pouvait augmenter l'effet du resvératrol, des tests de prolifération cellulaire ont été effectués avec une combinaison de NS-398, un inhibiteur de COX-2, et le resvératrol. Étant donné que le NS-398 inhibe la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses de l'endomètre via l'inhibition de la COX-2 (Gao,2004), il aurait dû inhiber la prolifération cellulaire de toutes les cellules exprimant la COX-2. Par contre, il a seulement inhibé la prolifération cellulaire de deux des trois lignées possédant la COX-2, soient RL-95-2 et

Ishikawa, mais n'a pas fait diminuer la prolifération cellulaire des cellules HeLa. L'équipe de Sales *et al.* (2002) explique ceci par le fait que la surexpression de COX-1 chez les cellules HeLa entraîne une expression de COX-2, des récepteurs de la PGE₂ modulant l'AMPc et des facteurs angiogéniques Ang-1 et Ang-2. Donc, malgré l'inhibition de la COX-2, d'autres mécanismes compensent grâce à la surexpression de COX-1. Le NS-398 peut donc agir sur les cellules RL-95-2 qui expriment seulement la COX-2, car n'exprimant pas la COX-1, les cellules de cette lignée n'induisent pas les mécanismes de compensation décrits précédemment. Pour ce qui est des cellules Ishikawa, elles expriment la COX-1, donc les mécanismes de compensation, mais à un niveau inférieur aux cellules HeLa. De plus, la surexpression du récepteur inhibiteur EP3 dans cette lignée pourrait en partie expliquer la diminution de prolifération cellulaire, malgré la présence de COX-1. Puis, le NS-398 inhibe également la lignée cellulaire TOV-1078D qui n'exprime ni COX-1, ni COX-2, ce qui pourrait impliquer une action non spécifique du NS-398. Certaines équipes confirment que le NS-398 n'a pas seulement une action spécifique à la COX-2 (Hung,2000; Minter,2003). Pour ce qui est du resvératrol en présence de NS-398, le patron de prolifération cellulaire provoqué par différentes doses en resvératrol ne fut pas affecté par la présence de NS-398, indiquant ainsi qu'une combinaison d'inhibiteurs de COXs n'augmente pas l'effet du resvératrol seul. Le resvératrol n'a donc pas la capacité d'interagir en synergie avec la molécule inhibitrice de la COX-2, le NS-398. Une autre étude va dans le même sens et démontre également que le resvératrol n'a pas la capacité d'agir en synergie, mais cette fois-ci avec une molécule chimiothérapeutique, le paclitaxel (Kubota,2003). En effet, le resvératrol combiné au paclitaxel au niveau du cancer du foie a le même effet que le resvératrol employé seul. Afin de déterminer si le resvératrol peut agir en synergie avec d'autres molécules chimiothérapeutiques au niveau du cancer endométrial humain, il serait important d'effectuer d'autres essais de prolifération cellulaire avec des molécules, telles le paclitaxel, le cisplatine et la doxorubicine, en combinaison avec le resvératrol.

Pour ce qui est de l'effet du resvératrol sur l'activité PGE₂, des essais de prolifération cellulaire ont été effectués en présence de différentes doses de resvératrol et de PGE₂. La prolifération cellulaire n'est pas induite chez les cellules cancéreuses

Ishikawa en présence de PGE₂. Pourtant la lignée cellulaire Ishikawa expriment l'ARNm des récepteurs à la PGE₂, surtout du récepteur EP3. L'incapacité de la PGE₂ à induire la prolifération cellulaire chez cette lignée pourrait s'expliquer par le fait qu'il y a peut-être un problème au niveau de la traduction de l'ARNm du récepteur en protéine. Pour confirmer ceci, des analyses de type Western blot avec l'anticorps spécifique au récepteur EP3 devront être effectuées. Une autre explication viendrait également du fait que le récepteur peut être présent, mais non fonctionnel. Dans ce cas, des tests d'activité du récepteur devront également être effectués. L'explication la plus plausible demeure toutefois le fait que le récepteur EP3 à la PGE₂ est généralement associé à une diminution d'AMPc intracellulaire. Il est donc un récepteur inhibiteur et ne permettrait pas la prolifération cellulaire (Narumiya,1999). L'équilibre entre la présence du récepteur EP3 inhibiteur et la présence plus faible des trois autres récepteurs activateurs pourrait expliquer le fait que la prolifération cellulaire des cellules Ishikawa reste inchangée suite à différentes doses en PGE₂. Pour confirmer ceci, du RT-PCR quantitatif et des analyses de type Western blot devront être effectués pour chaque isoforme du récepteur EP3. Les cellules cancéreuses TOV-1078D, quant à elle, ne produisent pas de PGE₂ et possèdent des taux quasi-indétectables d'ARNm des quatre récepteurs à la PGE₂, ce qui explique le fait que différentes doses en PGE₂ n'induisent pas la prolifération cellulaire. Le resvératrol agit sur la prolifération cellulaire des deux lignées cellulaires de la même manière en absence ou en présence de PGE₂, ce qui indique que le resvératrol n'a pas d'action directe sur la PGE₂. Bien que le resvératrol permet une diminution de la production en PGE₂, elle n'agit pas sur l'activité de la PGE₂.

Dans la présente étude, tout porte à croire que le resvératrol a un potentiel effet anti-cancérigène au niveau du cancer de l'endomètre chez la femme. L'objectif de cette étude n'était pas de déterminer une dose efficace, mais bien de déterminer si le resvératrol a ou non un effet au niveau du cancer endométrial humain. Bien que l'efficacité varie d'une lignée cellulaire à une autre (ex.: le resvératrol est plus efficace chez les cellules Ishikawa que chez les cellules RL-95-2), nous avons tout de même démontré que le resvératrol induit l'apoptose chez cinq des six lignées cellulaires à

l'étude. Par contre, on remarque que les effets sont plus prononcés à forte dose, soit à 100 μM en resvératrol. Dans ce sens, cela indique que le resvératrol devra être consommé à forte dose pour être efficace. Par contre, la concentration en resvératrol de la majorité des vins rouges dépasse rarement 65 μM . La question est de savoir si, à cette concentration, le resvératrol a un effet sur les cellules cancéreuses de l'endomètre. En ce qui concerne la prolifération cellulaire, nous avons pu remarquer une diminution de la prolifération cellulaire de toutes les lignées cellulaires étudiées sauf des cellules KLE pour cette dose. Par contre, pour ce qui est de l'effet du resvératrol sur l'apoptose et la production en PGE_2 , nous avons seulement ciblé trois doses (0, 10 et 100 μM). Il nous est donc impossible de savoir l'effet du resvératrol aux doses se situant entre celles-ci. On ne peut donc pas savoir si ces concentrations sont efficaces. Pour le savoir, cette même étude devra être effectuée avec les différentes concentrations fréquemment retrouvées dans ces vins rouges.

Considérant le fait que le resvératrol est présent en concentration suffisante pour avoir un effet anti-cancer sur des lignées cancéreuses, il faut toutefois considérer le fait que chez l'humain, le resvératrol doit être absorbé par l'organisme et se rendre au tissu cible, dans ce cas l'utérus, afin d'y effectuer son action. Donc, malgré le fait que le resvératrol soit en concentration suffisante, il doit être fortement absorbé par l'intestin afin d'aller effectuer son action. Quelques études ont été publiées à ce sujet. On sait que le resvératrol est absorbé indépendamment du repas avec lequel s'est pris la consommation en vin rouge (Vitaglione, 2005). En effet, que le resvératrol soit consommé avec un repas normal, pauvre ou riche en lipide, la quantité de resvératrol absorbée au niveau intestinal sera la même. Par contre, une récente étude dénote que 75% de la quantité de resvératrol absorbée est rapidement excrétée dans les urines et les fèces (Wenzel, 2005). Donc, lorsque l'on consomme un vin rouge à forte concentration en resvératrol, la majorité du resvératrol serait rapidement éliminé, ne pourrait donc pas agir. On se retrouvera alors avec une faible concentration en resvératrol. Il faut alors se demander si les très faibles concentrations en resvératrol ne pourraient pas avoir un effet anti-cancer, tout comme les très fortes concentrations. Dans ce cas, une étude semblable

à celle-ci devra être effectuée, mais cette fois-ci avec des concentrations très faibles, de l'ordre du nanomolaire, voire même plus faibles.

Ainsi, la présente étude démontre un potentiel anti-cancer du resvératrol au niveau de l'endomètre à fortes doses, mais le fait que cette molécule soit rapidement métabolisée par l'organisme nous porte à croire qu'une consommation régulière et modérée en vin rouge ne serait peut-être pas la bonne solution pour prévenir ces cancers. Par contre, des études avec des cellules saines préalablement traitées au resvératrol et, par la suite, mises en contact avec divers éléments cancérigènes pourraient nous renseigner davantage sur l'effet préventif du resvératrol. Dans un autre ordre d'idée, la possibilité d'utiliser le resvératrol comme traitement contre ce cancer serait peut-être plausible. Dans ce cas, le resvératrol devra être extrait ou synthétisé afin d'avoir accès rapidement à des doses plus importantes. Sachant qu'une petite partie du resvératrol ingéré aura la possibilité d'agir, des traitements utilisant des doses encore plus élevées que 100 μM en resvératrol pourrait être envisagés. De plus, d'autres voies d'administration du traitement au resvératrol pourraient être utilisées. En effet, le resvératrol, s'il était administré directement dans l'utérus par la voie vaginale, aurait une action plus directe, donc une dose de l'ordre du 100 μM pourrait être envisagée comme traitement. Une autre voie d'administration qui serait plus efficace serait la voie intraveineuse. Dans ce cas, la quantité totale de resvératrol administrée se retrouverait dans le sang, sans avoir à traverser les barrières du système gastro-intestinal, et pourrait alors agir directement sur la cible, dans ce cas-ci l'endomètre.

Ce présent travail n'est qu'un premier pas dans l'étude future des effets du resvératrol au niveau du cancer de l'endomètre chez l'humain. En effet, cette étude n'a été effectuée que sur six lignées cancéreuses utérines. Il serait donc important d'examiner les effets du resvératrol sur d'autres lignées cellulaires et sur des biopsies de cancers endométriaux afin d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'action du resvératrol. De plus, des études sur des cellules saines de l'endomètre devront être effectuées. En effet, il est important de savoir si le resvératrol est aussi bénéfique dans des conditions dites normales. Bien que nous sommes encore loin de conclure hors de

tout doute de l'effet du resvératrol, il nous faudra effectuer des études cliniques et épidémiologiques avec cette molécule si l'on veut, un jour, envisager un traitement des cancers endométriaux.

En conclusion, cette étude démontre, pour la toute première fois, l'effet du resvératrol sur la production en PGE_2 , la prolifération et la mort cellulaire chez six lignées utérines cancéreuses humaines. En effet, le resvératrol induit une diminution de la prolifération cellulaire et une mort apoptotique chez toutes les lignées cellulaires possédant la COX-1 et/ou la COX-2 (HeLa, HEC-1-A, RL-95-2 et Ishikawa) et ce, par l'inhibition probable de l'activité des COXs, par conséquent, par une diminution de la production en PGE_2 . Par contre, le resvératrol agit de manière différente chez les deux lignées cellulaires n'exprimant ni COX-1, ni COX-2 (KLE et TOV-1078D). La lignée KLE est résistante au resvératrol alors que ce dernier induit l'apoptose chez la lignée TOV-1078D. Donc, dans les cas de cancers de l'endomètre, le resvératrol peut avoir une autre cible que l'activité des COXs, mais il n'agit pas au niveau de la PI 3-k, PKA, PKC, MEK-1 et p38 MAPK. Des études futures seraient nécessaires pour examiner différentes cibles potentielles du resvératrol dans l'utérus humain. Un traitement des cancers endométriaux au resvératrol est encore loin d'être envisagé. Par contre, cette étude démontre une fois de plus les bienfaits potentiels de cette molécule d'avenir: le resvératrol.

BIBLIOGRAPHIE

Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., Takada, Y. (2004), "Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies", *Anticancer Res.* 24: 2783-2840.

Ashby, B. (1998), "Co-expression of prostaglandin receptors with opposite effects: a model for homeostatic control of autocrine and paracrine signaling", *Biochem.Pharmacol.* 55: 239-246.

Atten, M. J., Attar, B. M., Milson, T., Holian, O. (2001), "Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C-mediated mechanism", *Biochem.Pharmacol.* 62: 1423-1432.

Bhat, K. P., Lantvit, D., Christov, K., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. (2001a), "Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models", *Cancer Res.* 61: 7456-7463.

Bhat, K. P., Pezzuto, J. M. (2001b), "Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells", *Cancer Res.* 61: 6137-6144.

Bhattacharya, M., Peri, K., Ribeiro-da-Silva, A., Almazan, G., Shichi, H., Hou, X., Varma, D. R., Chemtob, S. (1999), "Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope", *J.Biol.Chem.* 274: 15719-15724.

Bhattacharya, M., Peri, K. G., Almazan, G., Ribeiro-da-Silva, A., Shichi, H., Durocher, Y., Abramovitz, M., Hou, X., Varma, D. R., Chemtob, S. (1998), "Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 15792-15797.

Blatteis, C. M., Li, S., Li, Z., Feleder, C., Perlik, V. (2005), "Cytokines, PGE2 and endotoxin fever: a re-assessment", *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 76: 1-18.

Bowers, J. L., Tyulmenkov, V. V., Jernigan, S. C., Klinge, C. M. (2000), "Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta", *Endocrinology* 141: 3657-3667.

Bulletti, C., De Ziegler, D., Albonetti, A., Flamigni, C. (1998), "Paracrine regulation of menstruation", *J.Reprod.Immunol.* 39: 89-104.

Burke, C. (2005), "Endometrial cancer and tamoxifen", *Clin.J.Oncol.Nurs.* 9: 247-249.

Carbo, N., Costelli, P., Baccino, F. M., Lopez-Soriano, F. J., Argiles, J. M. (1999), "Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model", *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 254: 739-743.

Celotti, E., Ferrarini, R., Zironi, R., Conte, L. S. (1996), "Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone", *J.Chromatogr.A* 730: 47-52.

Chen, B., Pan, H., Zhu, L., Deng, Y., Pollard, J. W. (2005), "Progesterone inhibits the estrogen-induced phosphoinositide 3-kinase-->AKT-->GSK-3beta-->cyclin D1-->pRB pathway to block uterine epithelial cell proliferation", *Mol.Endocrinol.* 19: 1978-1990.

Chulada, P. C., Thompson, M. B., Mahler, J. F., Doyle, C. M., Gaul, B. W., Lee, C., Tiano, H. F., Morham, S. G., Smithies, O., Langenbach, R. (2000), "Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice", *Cancer Res.* 60: 4705-4708.

Clement, M. V., Hirpara, J. L., Chawdhury, S. H., Pervaiz, S. (1998), "Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells", *Blood* 92: 996-1002.

Coleman, R. A., Smith, W. L., Narumiya, S. (1994), "International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes", *Pharmacol.Rev.* 46: 205-229.

Connor, P., Talavera, F., Kang, J. S., Burke, J., Roberts, J., Menon, K. M. (1997), "Epidermal growth factor activates protein kinase C in the human endometrial cancer cell line HEC-1-A", *Gynecol.Oncol.* 67: 46-50.

Dabizzi, S., Noci, I., Borri, P., Borrani, E., Giachi, M., Balzi, M., Taddei, G. L., Marchionni, M., Scarselli, G. F., Arcangeli, A. (2003), "Luteinizing hormone increases human endometrial cancer cells invasiveness through activation of protein kinase A", *Cancer Res.* 63: 4281-4286.

Davies, S., Dai, D., Pickett, G., Leslie, K. K. (2005), "Gene regulation profiles by progesterone and dexamethasone in human endometrial cancer Ishikawa H cells", *Gynecol.Oncol.*

de la Lastra, C. A., Villegas, I. (2005), "Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications", *Mol.Nutr.Food Res.* 49: 405-430.

De Ruvo, C., Amodio, R., Algeri, S., Martelli, N., Intilangelo, A., D'Ancona, G. M., Esposito, E. (2000), "Nutritional antioxidants as antidegenerative agents", *Int.J.Dev.Neurosci.* 18: 359-366.

Delmas, D., Jannin, B., Cherkaoui, M. M., Latruffe, N. (2000), "Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines", *Oncol.Rep.* 7: 847-852.

Deslypere, J. P., Verdonck, L., Vermeulen, A. (1985), "Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism", *J.Clin.Endocrinol.Metab* 61: 564-570.

- DeWitt, D. L. (1991), "Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression", *Biochim.Biophys.Acta* 1083: 121-134.
- Dore, S. (2005), "Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity", *Neurosignals*. 14: 61-70.
- Draczynska-Lusiak, B., Doung, A., Sun, A. Y. (1998), "Oxidized lipoproteins may play a role in neuronal cell death in Alzheimer disease", *Mol.Chem.Neuropathol*. 33: 139-148.
- Driver, H. E., Swann, P. F. (1987), "Alcohol and human cancer (review)", *Anticancer Res*. 7: 309-320.
- DuBois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., Lipsky, P. E. (1998), "Cyclooxygenase in biology and disease", *FASEB J*. 12: 1063-1073.
- El Mowafy, A. M., White, R. E. (1999), "Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects", *FEBS Lett*. 451: 63-67.
- ElAttar, T. M., Virji, A. S. (1999), "Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation", *Anticancer Drugs* 10: 187-193.
- Estrov, Z., Shishodia, S., Faderl, S., Harris, D., Van, Q., Kantarjian, H. M., Talpaz, M., Aggarwal, B. B. (2003), "Resveratrol blocks interleukin-1 β -induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells", *Blood* 102: 987-995.
- Fisher, B., Costantino, J. P., Redmond, C. K., Fisher, E. R., Wickerham, D. L., Cronin, W. M. (1994), "Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14", *J.Natl.Cancer Inst*. 86: 527-537.
- Fitzpatrick, F. A., Aguirre, R., Pike, J. E., Lincoln, F. H. (1980), "The stability of 13,14-dihydro-15 keto-PGE₂", *Prostaglandins* 19: 917-931.
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., Kinsella, J. E. (1993), "Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine", *Lancet* 341: 454-457.
- Franz, W. B., III (1988), "Basic review: endocrinology of the normal menstrual cycle", *Prim.Care* 15: 607-616.
- Fremont, L. (2000), "Biological effects of resveratrol", *Life Sci*. 66: 663-673.

- Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K., Asselin, E. (2004a), "AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells", *Gynecol.Oncol.* 94: 785-795.
- Gagnon, V., St Germain, M. E., Descoteaux, C., Provencher-Mandeville, J., Parent, S., Mandal, S. K., Asselin, E., Berube, G. (2004b), "Biological evaluation of novel estrogen-platinum(II) hybrid molecules on uterine and ovarian cancers-molecular modeling studies", *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 14: 5919-5924.
- Gambrell, R. D., Jr. (1977), "Estrogens, progestogens and endometrial cancer", *J.Reprod.Med.* 18: 301-306.
- Gao, J., Niwa, K., Sun, W., Takemura, M., Lian, Z., Onogi, K., Seishima, M., Mori, H., Tamaya, T. (2004), "Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit cellular proliferation and upregulate cyclooxygenase-2 protein expression in endometrial cancer cells", *Cancer Sci.* 95: 901-907.
- Gehm, B. D., McAndrews, J. M., Chien, P. Y., Jameson, J. L. (1997), "Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 14138-14143.
- Goldberg, D. M., Tsang, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E., Soleas, G., Ng, E. (1996), "Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines", *Anal.Chem.* 68: 1688-1694.
- Goodman, M. T., Hankin, J. H., Wilkens, L. R., Lyu, L. C., McDuffie, K., Liu, L. Q., Kolonel, L. N. (1997), "Diet, body size, physical activity, and the risk of endometrial cancer", *Cancer Res.* 57: 5077-5085.
- Gosden, R., Spears, N. (1997), "Programmed cell death in the reproductive system", *Br.Med.Bull.* 53: 644-661.
- Griffiths, A.J.F., Gelbart W.M., Miller J.H., Lewontin R.C. (2001), "Analyse génétique moderne", De Boeck Université, Paris, FRA.
- Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D. G., Mukhtar, H. (2000), "Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma", *Prostate* 42: 73-78.
- Halme, J., White, C., Kauma, S., Estes, J., Haskill, S. (1988), "Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity in vitro", *J.Clin.Endocrinol.Metab* 66: 1044-1049.
- Hamberg, M., Samuelsson, B. (1971), "On the metabolism of prostaglandins E 1 and E 2 in man", *J.Biol.Chem.* 246: 6713-6721.
- Holmes-McNary, M., Baldwin, A. S., Jr. (2000), "Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase", *Cancer Res.* 60: 3477-3483.

- Hsieh, T. C., Wu, J. M. (1999), "Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines", *Exp.Cell Res.* 249: 109-115.
- Hung, W. C., Chang, H. C., Pan, M. R., Lee, T. H., Chuang, L. Y. (2000), "Induction of p27(KIP1) as a mechanism underlying NS398-induced growth inhibition in human lung cancer cells", *Mol.Pharmacol.* 58: 1398-1403.
- Hwang, D., Scollard, D., Byrne, J., Levine, E. (1998), "Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer", *J.Natl.Cancer Inst.* 90: 455-460.
- Ishihara, O., Tsutsumi, O., Mizuno, M., Kinoshita, K., Satoh, K. (1986), "Metabolism of arachidonic acid and synthesis of prostanoids in human endometrium and decidua", *Prostaglandins Leukot.Med.* 24: 93-102.
- Jabbour, H. N., Boddy, S. C. (2003), "Prostaglandin E2 induces proliferation of glandular epithelial cells of the human endometrium via extracellular regulated kinase 1/2-mediated pathway", *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88: 4481-4487.
- Jabbour, H. N., Kelly, R. W., Boddy, S. C. (2002), "Autocrine/paracrine regulation of apoptosis in epithelial cells by prostaglandin E2", *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 67: 357-363.
- James, W. P. (2003), "Nutrition and cancer--translating science into practice. Symposium summary", *Forum Nutr.* 56: 187-188.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. (1997), "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes", *Science* 275: 218-220.
- Kampa, M., Hatzoglou, A., Notas, G., Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P. M., Castanas, E. (2000), "Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines", *Nutr.Cancer* 37: 223-233.
- Kanamori, Y., Kigawa, J., Itamochi, H., Shimada, M., Takahashi, M., Kamazawa, S., Sato, S., Akeshima, R., Terakawa, N. (2001), "Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma", *Clin.Cancer Res.* 7: 892-895.
- Kaneuchi, M., Sasaki, M., Tanaka, Y., Yamamoto, R., Sakuragi, N., Dahiya, R. (2003), "Resveratrol suppresses growth of Ishikawa cells through down-regulation of EGF", *Int.J.Oncol.* 23: 1167-1172.
- Keil, U., Chambless, L. E., Doring, A., Filippiak, B., Stieber, J. (1997), "The relation of alcohol intake to coronary heart disease and all-cause mortality in a beer-drinking population", *Epidemiology* 8: 150-156.

- Kelly, R. W. (1995), "Immunosuppressive mechanisms in semen: implications for contraception", *Hum.Reprod.* 10: 1686-1693.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972), "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", *Br.J.Cancer* 26: 239-257.
- Kim, Y. A., Choi, B. T., Lee, Y. T., Park, D. I., Rhee, S. H., Park, K. Y., Choi, Y. H. (2004), "Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells", *Oncol.Rep.* 11: 441-446.
- Kirschenbaum, A., Klausner, A. P., Lee, R., Unger, P., Yao, S., Liu, X. H., Levine, A. C. (2000), "Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate", *Urology* 56: 671-676.
- Kubota, T., Uemura, Y., Kobayashi, M., Taguchi, H. (2003), "Combined effects of resveratrol and paclitaxel on lung cancer cells", *Anticancer Res.* 23: 4039-4046.
- Kufe, D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C., Jr., Gansler T.S., Holland J.F., Frei III E. (2003), "Cancer Medecine, 5ième Édition", Hamilton, CAN.
- Kulkarni, S., Rader, J. S., Zhang, F., Liapis, H., Koki, A. T., Masferrer, J. L., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J. (2001), "Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer", *Clin.Cancer Res.* 7: 429-434.
- Kundu, J. K., Chun, K. S., Kim, S. O., Surh, Y. J. (2004), "Resveratrol inhibits phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse skin: MAPKs and AP-1 as potential molecular targets", *Biofactors* 21: 33-39.
- Langcake, P., Pryce, R. J. (1977), "A new class of phytoalexins from grapevines", *Experientia* 33: 151-152.
- Lodish, H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000), "Molecular Cell biology, Fourth ed.", New-York, U.S.A
- Lumsden, M. A., Brown, A., Baird, D. T. (1984), "Prostaglandin production from homogenates of separated glandular epithelium and stroma from human endometrium", *Prostaglandins* 28: 485-496.
- MacDonald, P. C., Porter, J. C., Schwarz, B. E., Johnston, J. M. (1978), "Initiation of parturition in the human female", *Semin.Perinatol.* 2: 273-286.
- Martinez, J., Moreno, J. J. (2000), "Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production", *Biochem.Pharmacol.* 59: 865-870.
- Mattson, D. L., Bellehumeur, T. G. (1996), "Comparison of three chemiluminescent horseradish peroxidase substrates for immunoblotting", *Anal.Biochem.* 240: 306-308.

- McDaid, H. M., Cairns, M. T., Atkinson, R. J., McAleer, S., Harkin, D. P., Gilmore, P., Johnston, P. G. (1999), "Increased expression of the RI α subunit of the cAMP-dependent protein kinase A is associated with advanced stage ovarian cancer", *Br.J.Cancer* 79: 933-939.
- Mgbonyebi, O. P., Russo, J., Russo, I. H. (1998), "Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells", *Int.J.Oncol.* 12: 865-869.
- Minter, H. A., Eveson, J. W., Huntley, S., Elder, D. J., Hague, A. (2003), "The cyclooxygenase 2-selective inhibitor NS398 inhibits proliferation of oral carcinoma cell lines by mechanisms dependent and independent of reduced prostaglandin E2 synthesis", *Clin.Cancer Res.* 9: 1885-1897.
- Muggia, F. M. (2004), "Recent updates in the clinical use of platinum compounds for the treatment of gynecologic cancers", *Semin.Oncol.* 31: 17-24.
- Mutoh, M., Takahashi, M., Fukuda, K., Matsushima-Hibiya, Y., Mutoh, H., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2000), "Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure", *Carcinogenesis* 21: 959-963.
- Nakanishi, C., Toi, M. (2005), "Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs", *Nat.Rev.Cancer* 5: 297-309.
- Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A., Narumiya, S. (1993), "Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity", *Nature* 365: 166-170.
- Narko, K., Ristimaki, A., MacPhee, M., Smith, E., Haudenschild, C. C., Hla, T. (1997), "Tumorigenic transformation of immortalized ECV endothelial cells by cyclooxygenase-1 overexpression", *J.Biol.Chem.* 272: 21455-21460.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. (1999), "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions", *Physiol Rev.* 79: 1193-1226.
- National Cancer Institute (2001), "What you need to know about cancer of the uterus", NIH publication, Bethesda, USA.
- Okada, H., Mak, T. W. (2004), "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells", *Nat.Rev.Cancer* 4: 592-603.
- Okuno, K., Jinnai, H., Lee, Y. S., Nakamura, K., Hirohata, T., Shigeoka, H., Yasutomi, M. (1995), "A high level of prostaglandin E2 (PGE2) in the portal vein suppresses liver-associated immunity and promotes liver metastases", *Surg.Today* 25: 954-958.

Olson, S. H., Vena, J. E., Dorn, J. P., Marshall, J. R., Zielezny, M., Laughlin, R., Graham, S. (1997), "Exercise, occupational activity, and risk of endometrial cancer", *Ann.Epidemiol.* 7: 46-53.

Pace-Asciak, C. R., Hahn, S., Diamandis, E. P., Soleas, G., Goldberg, D. M. (1995), "The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease", *Clin.Chim.Acta* 235: 207-219.

Pan, Q., Bao, L. W., Kleer, C. G., Sabel, M. S., Griffith, K. A., Teknos, T. N., Merajver, S. D. (2005), "Protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy", *Cancer Res.* 65: 8366-8371.

Peele, S. (1997), "Utilizing culture and behaviour in epidemiological models of alcohol consumption and consequences for Western nations", *Alcohol Alcohol* 32: 51-64.

Pendurthi, U. R., Williams, J. T., Rao, L. V. (1999), "Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells : A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19: 419-426.

Pickles, V. R., Hall, W. J., Best, F. A., Smith, G. N. (1965), "Prostaglandins in endometrium and menstrual fluid from normal and dysmenorrhoeic subjects", *J.Obstet.Gynaecol.Br.Commonw.* 72: 185-192.

Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Mulero-Navarro, S., Santiago-Josefat, B., Fernandez-Salguero, P. M. (2002), "The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle", *Biochem.Pharmacol.* 64: 1375-1386.

Pozo-Guisado, E., Lorenzo-Benayas, M. J., Fernandez-Salguero, P. M. (2004), "Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation", *Int.J.Cancer* 109: 167-173.

Prodi, G., De Giovanni, C., Galli, M. C., Gola, G., Grilli, S., Rocchetta, R., Orlandi, C. (1979), "17 beta-estradiol, 5 alpha-dihydrotestosterone, progesterone and cortisol receptors in normal and neoplastic human endometrium", *Tumori* 65: 241-253.

Sales, K. J., Jabbour, H. N. (2003), "Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium", *Reproduction.* 126: 559-567.

Sales, K. J., Katz, A. A., Howard, B., Soeters, R. P., Millar, R. P., Jabbour, H. N. (2002), "Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1", *Cancer Res.* 62: 424-432.

- Schneider, Y., Vincent, F., Duranton, B., Badolo, L., Gosse, F., Bergmann, C., Seiler, N., Raul, F. (2000), "Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells", *Cancer Lett.* 158: 85-91.
- Singh, E. J., Baccarini, I., Zuspan, F. P. (1975), "Levels of prostaglandins F-2alpha and E-2 in human endometrium during the menstrual cycle", *Am.J.Obstet.Gynecol.* 121: 1003-1006.
- Slater, S. J., Seiz, J. L., Cook, A. C., Stagliano, B. A., Buzas, C. J. (2003), "Inhibition of protein kinase C by resveratrol", *Biochim.Biophys.Acta* 1637: 59-69.
- Smith, S. K. (1989), "Prostaglandins and growth factors in the endometrium", *Baillieres Clin.Obstet.Gynaecol.* 3: 249-270.
- St Germain, M. E., Gagnon, V., Parent, S., Asselin, E. (2004), "Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway", *Mol.Cancer* 3: 7.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P. E. (2005), "Role of lycopene and tomato products in prostate health", *Biochim.Biophys.Acta* 1740: 202-205.
- Stevens, A., Lowe J. (2000), "Pathology, second edition", Mosby, Toronto, CAN.
- Stewart, J. R., Christman, K. L., O'Brian, C. A. (2000), "Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation", *Biochem.Pharmacol.* 60: 1355-1359.
- Subbaramaiah, K., Chung, W. J., Michaluart, P., Telang, N., Tanabe, T., Inoue, H., Jang, M., Pezzuto, J. M., Dannenberg, A. J. (1998), "Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells", *J.Biol.Chem.* 273: 21875-21882.
- Subbaramaiah, K., Michaluart, P., Chung, W. J., Tanabe, T., Telang, N., Dannenberg, A. J. (1999), "Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells", *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 889: 214-223.
- Subbaramaiah, K., Zakim, D., Weksler, B. B., Dannenberg, A. J. (1997), "Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention", *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 216: 201-210.
- Szewczuk, L. M., Forti, L., Stivala, L. A., Penning, T. M. (2004), "Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents", *J.Biol.Chem.* 279: 22727-22737.
- Taniguchi, F., Harada, T., Sakamoto, Y., Yamauchi, N., Yoshida, S., Iwabe, T., Terakawa, N. (2003), "Activation of mitogen-activated protein kinase pathway by

keratinocyte growth factor or fibroblast growth factor-10 promotes cell proliferation in human endometrial carcinoma cells", *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88: 773-780.

Thom, M. H., Studd, J. W. (1980), "Oestrogens and endometrial hyperplasia", *Br.J.Hosp.Med.* 23: 506, 508-3.

Thomas, D. B. (1995), "Alcohol as a cause of cancer", *Environ.Health Perspect.* 103 Suppl 8: 153-160.

Tong, B. J., Tan, J., Tajeda, L., Das, S. K., Chapman, J. A., DuBois, R. N., Dey, S. K. (2000), "Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-delta in human endometrial adenocarcinoma", *Neoplasia.* 2: 483-490.

Tortora, G.J., Grabowski S.R. (2001), "Principe d'anatomie et de physiologie", Les Éditions du Renouveau Pédagogique, Saint-Laurent, CAN.

Tredici, G., Miloso, M., Nicolini, G., Galbiati, S., Cavaletti, G., Bertelli, A. (1999), "Resveratrol, map kinases and neuronal cells: might wine be a neuroprotectant?", *Drugs Exp.Clin.Res.* 25: 99-103.

Trifan, O. C., Hla, T. (2003), "Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis", *J.Cell Mol.Med.* 7: 207-222.

Tsujii, M., Kawano, S., DuBois, R. N. (1997), "Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 3336-3340.

Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R. N. (1998), "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells", *Cell* 93: 705-716.

Uegaki, K., Kanamori, Y., Kigawa, J., Kawaguchi, W., Kaneko, R., Naniwa, J., Takahashi, M., Shimada, M., Oishi, T., Itamochi, H., Terakawa, N. (2005), "PTEN-positive and phosphorylated-Akt-negative expression is a predictor of survival for patients with advanced endometrial carcinoma", *Oncol.Rep.* 14: 389-392.

Uotila, P. J., Erkkola, R. U., Klemi, P. J. (2002), "The expression of cyclooxygenase-1 and -2 in proliferative endometrium and endometrial adenocarcinoma", *Ann.Med.* 34: 428-433.

Vitaglione, P., Sforza, S., Galaverna, G., Ghidini, C., Caporaso, N., Vescovi, P. P., Fogliano, V., Marchelli, R. (2005), "Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans", *Mol.Nutr.Food Res.* 49: 495-504.

Wenzel, E., Somoza, V. (2005), "Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol", *Mol.Nutr.Food Res.* 49: 472-481.

Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S. S. (2004), "Flavonoids in food and their health benefits", *Plant Foods Hum.Nutr.* 59: 113-122.

Yuan, J. M., Ross, R. K., Gao, Y. T., Henderson, B. E., Yu, M. C. (1997), "Follow up study of moderate alcohol intake and mortality among middle aged men in Shanghai, China", *BMJ* 314: 18-23.